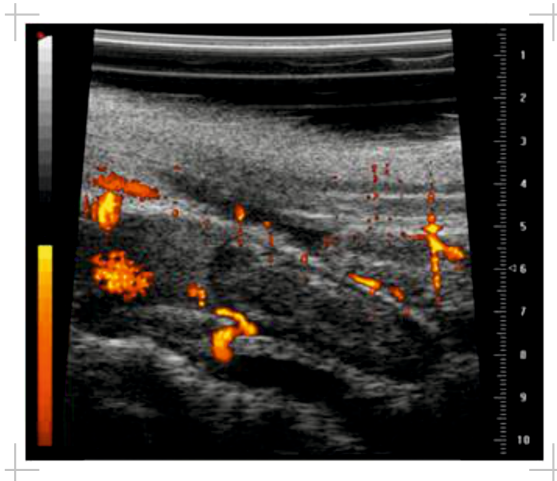


Einfluss inflammatorischer Zellen auf die Thrombusentstehung und -auflösung im Mausmodell der venösen Thrombose

Tanja Schönfelder



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2017

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2017

© 2017 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition linguistique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie
und -Biochemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Professor Dr. Rüdiger Gerstberger
und
dem Centrum für Thrombose und Hämostase
der Universitätsmedizin Mainz
Priv.-Doz. Dr. med. Philip Wenzel

Einfluss inflammatorischer Zellen auf die Thrombusentstehung und -auflösung im Mausmodell der venösen Thrombose

INAUGURAL-DISSERTATION
Zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Tanja Schönfelder
Tierärztin aus Hanau

Gießen, 2016

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Herr Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger
Prof. Dr. Philip Wenzel

Tag der Disputation: 16. Dezember 2016

Für meinen Mann Ruben

Inhalt

I. Einleitung	6
1. Venöse Thrombose	7
1.1 Definition	7
1.2 Morphologie der Vene	7
1.3 Allgemeine Struktur und Funktion des Endothels	8
1.4 Entstehung einer venösen Thrombose	9
1.5 Komplikationen im weiteren Verlauf einer venösen Thrombose	11
1.6 Natürliche Thrombenauflösung	13
1.7 Mausmodelle der venösen Thrombose	14
2. Einfluss inflammatorischer Zellen im Geschehen der venösen Thrombose	17
2.1 Leukozyten	17
2.1.1 Monozyten/Makrophagen	18
2.1.2 Neutrophile Granulozyten	19
2.1.3 Lymphozyten	20
T _H 1- und T _H 2-Immunantworten	21
2.2 Die Rolle der Leukozyten im Entstehungsprozess der venösen Thrombose	23
2.3 Die Rolle von Leukozyten im Auflösungsprozess der venösen Thrombose	25
II. Zielsetzung	28
1. <i>Standardisierung und Evaluation der sonographischen Darstellung von venösen Thromben im Vena cava caudalis Stenose Modell</i>	28
2. <i>Genauere Betrachtung des verwendeten Mausmodells und Darstellung des Einflusses venöser Seitenäste auf die Thrombenentstehung</i>	28
3. <i>Evaluation der FACS-Analyse von Thromben- und Venengewebe zur Untersuchung der vorhandenen Leukozytenpopulation</i>	28
4. <i>Charakterisierung der Auswirkung auf die Thrombenentstehung und Auflösung durch die Depletion von Monozyten/Makrophagen im Modell der LysMCre-IDTR Maus</i>	28
5. <i>Untersuchung der Auswirkung einer Verschiebung zur T_H2 Immunantwort auf den Auflösungsprozess venöser Thromben</i>	28
6. <i>Auswirkung auf die Bildung eines venösen Thrombus in der Abwesenheit von CD4-positiven Zellen</i>	29
III. Material	30
1. Laborgeräte und technisches Zubehör	30
2. Chirurgische Instrumente	31
3. Verbrauchsmaterialien	31
4. Chemikalien, gebrauchsfertige Lösungen	33
5. Reagenzien zur RNA-Analyse	35

6. Durchflusszytometrie	35
7. Primer	36
8. Puffer	36
9. Spezielle Software	37
IV. Methoden	38
1. Versuchstiere	38
1.1 Rechtliche Voraussetzungen	38
1.2 Haltung und Zucht der Versuchstiere	38
1.3 Kontrollstämme	39
1.3.1 C57BL/6J Mäuse	39
1.4 Transgene Stämme	39
1.4.1 Tbx 21 ko Mäuse	39
1.4.2 LysMCre Mäuse	40
1.4.3 iDTR (LysMCre-iDTR) Mäuse	40
1.5 Depletion der myelomonozytären Zellen unter Verwendung von Diphterietoxin in LysMCre-iDTR Mäusen	40
1.6 <i>In vivo</i> Depletion von CD4-positiven T-Zellen	43
2. Wahl und Durchführung der Narkose	44
2.1 Anästhesie für den operativen Eingriff (<i>Vena cava</i> Ligatur)	45
2.2 Anästhesie für sonographische Untersuchungen	46
3. Mausmodell der venösen Thrombose	46
4. Haltungsbedingungen der Tiere im Experiment	47
5. Sonographische Untersuchung	48
5.1 Apparativer Aufbau zur Ultraschalluntersuchung	48
5.2 Verwendete Darstellungsmethoden der Ultraschallsignale	50
5.2.1 B-Mode Darstellung	50
5.2.2 Duplex-Sonographie der Blutgefäße	51
5.2.3 Farbkodierte Doppler-Sonographie	52
5.3 Darstellung der <i>Vena cava caudalis</i> bei der Maus	53
6. Präparation von Blut, <i>Vena cava caudalis</i> und Thrombengewebe	54
6.1 Blutentnahme	54
6.2 Tötung der Maus und Präparation der <i>Vena cava caudalis</i> /Extraktion des Thrombenmaterials	55
6.3 Bestimmung des Thrombengewichtes	55
7. Analyse mittels Durchflusszytometrie	56
7.1 Prinzip der Durchflusszytometrie	56
7.2 Aufarbeitung der Proben zur Gewinnung verschiedener Leukozytenpopulationen	57

7.2.1 Aufarbeitung der Venen.....	57
7.2.2 Aufarbeitung der Thromben.....	59
7.2.3 Aufarbeitung des Blutes	59
7.2.4 Aufarbeitung des Blutes zur Analyse von apoptotischen Zellen	59
8. mRNA-Analyse mittels quantitativer Real-Time-PCR (qRT-PCR)	62
8.1 Prinzip der RNA-Analyse	62
8.2 Prinzip der qRT-PCR.....	62
8.3 RNA-Isolierung	63
8.4 Bestimmung der RNA-Konzentration	64
8.5 Durchführung der qRT-PCR	64
8.6 Auswertung der Ergebnisse.....	65
9. Statistische Analyse	65
V. Ergebnisse	67
1. Standardisierung und Evaluation der sonographischen Darstellung von venösen Thromben.....	67
1.1 Ermittlung der Flussgeschwindigkeit mit Hilfe der Duplex-Sonographie.....	67
2. Genauere Betrachtung des verwendeten Mausmodells und Darstellung des	70
2.1 Die Ligation venöser Seitenäste beeinflusst weder die Prävalenz der Thrombenbildung noch deren Gewicht	75
3. Analyse von Thromben- und Venengewebe hinsichtlich vorhandener Leukozytenpopulationen unter Verwendung der Durchflusszytometrie.....	76
3.1 Reduktion der Anzahl vitaler, CD45 positiver Zellen im Thrombengewebe im Verlauf des Auflösungsprozesses	76
3.2 Analyse der vitalen leukozytären Subpopulationen im Verlauf einer venösen Thrombose	77
3.2.1 Neutrophile Granulozyten	78
3.2.2 Monozyten.....	80
3.2.3 T- Zellen	81
3.2.4 Natürliche Killerzellen	86
4. Bedeutung immunkompetenter Zellen für die Entstehung und Auflösung venöser Thromben: Modellsystem der LysMCre-iDTR Maus	88
4.1 Depletion monozytärer, immunkompetenter Zellen im Modell der LysMCre-iDTR Maus.....	88
4.2 Einfluss einer Reduktion an monozytären Zellen auf die Thrombenentstehung im <i>Vena cava caudalis</i> Stenose Modell	89
4.3 Einfluss einer Reduktion an monozytären Zellen auf die Thrombenauflösung im <i>Vena cava caudalis</i> Stenose Modell	94

4.4 Veränderungen der Infiltration inflammatorischer Zellen und veränderte mRNA-Expressionswerte beeinflussen die Auflösung venöser Thromben im Modell der LysMCre-iDTR Maus	100
4.5 Potentielle Stimulation der Thrombusbildung durch Apoptose der monozytären Zellen der behandelten LysMCre-iDTR Maus	103
5. Auswirkung einer Verschiebung zur T _H 2 Immunantwort auf den Auflösungsprozess venöser Thromben im Modell der Tbx 21 knockout Maus.....	107
5.1 Verschiebung zur T _H 2 Immunantwort fördert den Auflösungsprozess im chronischen Stadium eines venösen Thrombus.....	107
5.2 Durchflusszytometrische Analyse der Leukozytenpopulationen im Rahmen des Auflösungsprozesses venöser Thromben in der Tbx 21 ko Maus	112
5.3 Verschiebung der Zytokinmuster zur T _H 2 Immunität und Reifung von M2-Makrophagen.....	114
6. Auswirkung auf die Bildung eines venösen Thrombus in der Abwesenheit von CD4 positiven Zellen	119
VI. Diskussion.....	124
1. Standardisierung und Evaluation der sonographischen Darstellung von venösen Thromben.....	124
2. Genauere Betrachtung des verwendeten Mausmodelles und Darstellung des Einflusses venöser Seitenäste auf die Thrombenentstehung	125
3. Evaluation der FACS-Analyse von Thromben- und Venengewebe zur Untersuchung der vorhandenen Leukozytenpopulation	126
4. Auswirkung auf die Thrombenentstehung und -auflösung im Modell der LysMCre-iDTR Maus	129
4.1 Eine Depletion monozytärer Zellen zeigt keinen Einfluss auf die Entstehung einer venösen Thrombose im Mausmodell der LysMCre-iDTR Maus	129
4.2 Eine Longitudinalstudie zeigte eine verbesserte Reduktion der Thrombenfläche im Mausmodell der LysMCre-iDTR Maus	130
4.3 Ein hoher Anteil an Monozyten im Thrombengewebe verbessert die Auflösung ...	132
4.4 Apoptotische Zellen in der Zirkulation stimulieren die Entstehung eines venösen Thrombus	134
4.5 Ein Anstieg von VCAM-1 und MCP-1 im Venengewebe fördert das Entstehen einer Thrombose	135
5. Untersuchung der Auswirkung einer Verschiebung zur T _H 2-Immunantwort auf den Auflösungsprozess venöser Thromben	136
5.1 Die Tbx 21 ko Maus zeigt eine verbesserte Auflösung des venösen Thrombus....	136
5.2 Die Verschiebung zur T _H 2-Immunantwort zeigt nur geringe Veränderungen in der zellulären Zusammensetzung vom Thrombengewebe	138
5.3 Die Zytokinmuster in der Tbx 21 ko Maus zeigen einen vermehrt antiinflammatorischen Phänotyp	139
6. Auswirkung auf die Bildung eines venösen Thrombus in Abwesenheit von CD4 positiven Zellen	143

VII. Zusammenfassung	145
VIII. Summary	147
IX. Literaturverzeichnis	148
X. Tabellenverzeichnis	163
XI. Abbildungsverzeichnis	164
XII. Abkürzungsverzeichnis	169
XIII. Danksagung	171

I. Einleitung

Jedes Jahr erkranken tausende Menschen an den Folgen einer tiefen Beinvenenthrombose. Die dadurch resultierende Thrombembolie führte alleine in Deutschland bei ca. 40.000 Menschen zum Tode⁶⁹. Deswegen zählt diese Erkrankung auch zu den häufigsten im kardiovaskulären Bereich und nimmt neben Schlaganfall und Herzinfarkt einen hohen Stellenwert ein.

Auch wenn die Grunderkrankung nicht zum Tode führt, so induziert sie doch in 50 Prozent der Fälle eine Heilungsstörung des betroffenen Gewebes und führt somit zum Entstehen eines postthrombotischen Syndroms. Dieses Krankheitsbild ist vielgestaltig und reicht von diskreten Schwellungen bis zu schweren Zirkulationsstörungen im Unterschenkelbereich.

Viele Prädispositionsfaktoren für die Entstehung einer tiefen Venenthrombose sind bereits bekannt, jedoch ist deren vollständige Aufklärung noch lückenhaft. In den letzten Jahren konnten viele Versuchsvorhaben einen weiteren Beitrag zur Pathogenese der Entstehung venöser Thromben sowie deren Auflösung leisten. Größtenteils wurde hier auf ein Tiermodell zurückgegriffen. Die Vorgänge im Organismus sind komplex und so ist es schwierig, die Interaktion von Gefäßwand, inflammatorischen Zellen, Thrombozyten und Koagulationsfaktoren auf andere Modelle zu übertragen, welche tierunabhängig untersucht werden können.

Der therapeutische Ansatz zur Behandlung einer venösen Thrombose besteht in der Gabe von gerinnungshemmenden Substanzen, jedoch ist dieser Einsatz durch die daraus resultierende Blutungsneigung limitiert. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, weniger risikobehaftete Therapieansätze zu finden. Auch bei der Behandlung des postthrombotischen Syndroms bieten Antikoagulation und physikalische Maßnahmen keine befriedigenden Resultate. Weitere therapeutische Ansätze könnten den Behandlungserfolg verstärken.

1. Venöse Thrombose

1.1 Definition

Der Begriff „Thrombose“ leitet sich vom griechischen Wort *thrombos* ab und bedeutet „geronnene Masse“. Es handelt sich hierbei um die Bildung von intravaskulären Gerinnseln, die vermehrt im venösen System auftreten. In den meisten Fällen führt die Thrombose zum Verschluss eines Gefäßes und kann durch die Dislokation von Thrombenmaterial eine Lungenembolie hervorrufen.

1.2 Morphologie der Vene

Im Allgemeinen bestehen die Wände der Blutgefäße aus drei Schichten. Von innen nach außen lassen sich die *Intima (Tunica intima)*, *Media (Tunica media)* und *Adventitia (Tunica adventitia oder externa)* unterscheiden⁸³. Die *Intima* stellt die Auskleidung des Gefäßes mit Endothel dar, wobei es sich um eine einlagige Zellschicht handelt. Angrenzend an die *Intima* befindet sich bei Venen zum Übergang in die *Media* im Vergleich zu den Arterien eine unvollständige *Membrana elastica interna*⁸³. Je nach Lokalisation der Venen weist die *Media* meist eine sehr dünne bis dünne Schicht an glatter Muskulatur auf. Die Muskelarchitektur kann sich sehr variabel darstellen und ist mit elastischen und kollagenen Fasern durchsetzt⁸³. In den Beinvenen ist die Muskulatur ausgeprägter als im Bereich der oberen Körperregion. Dies ist vor allem auf den dort herrschenden höheren hydrostatischen Druck zurückzuführen^{68, 83}. Bei den Venen ist die *Adventitia* die stärkste Schicht der Wandung und besteht aus lockerem Bindegewebe.

Das venöse System ist am geregelten Rückfluss des Blutes zum Herzen beteiligt und kann als Blutspeicher angesehen werden. Etwa 70 Prozent des im Kreislauf vorhandenen Blutes befinden sich in den Venen³¹. Um einen Rückfluss des venösen Blutes zu verhindern, sind in den Gefäßen Venenklappen ausgebildet. Hierbei handelt es sich um Ausstülpungen der inneren Gefäßwand (s. Abb. 1), welche die Strömungsrichtung des Blutes sichern. Jeweils zwei Klappen bilden ein Ventil, welches sich bei einer Strömungsumkehr verschließt^{68, 83}.

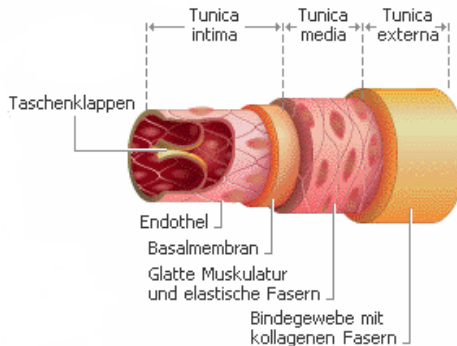


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aufbaues der Venenwand.
(Modifiziert nach ⁶⁷)

Dargestellt sind die verschiedenen Wandschichten eines venösen Gefäßes mit Angabe der darin enthaltenen Gewebetypen.

1.3 Allgemeine Struktur und Funktion des Endothels

Das Endothel stellt eine aktive Barriere zwischen Blut und Gewebe dar. Diese Zellschicht spielt eine bedeutende Rolle für die Entstehung und Auflösung von Thrombosen.

Hämostase/ Fibrinolyse

Die Zellen des Endothels können in den Prozess der Hämostase eingreifen, indem sie gerinnungshemmende Substanzen, wie den Thromboplastininhibitor (TFPI; "tissue factor pathway inhibitor") oder den Plasminogen-Aktivator vom Gewebetyp (tPA; "tissue(-type) plasminogen activator") gebildet werden, zum anderen aber auch gerinnungsfördernde Substanzen wie von-Willebrand-Faktor (vWF), Thromboplastin (TF; "tissue factor") und Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI-1)^{90, 126, 156}.

Entzündung

Die Bildung von bestimmten Zytokinen fördert den Entzündungsvorgang. Speziell die Interleukine (IL) 1, 6 und 8 führen zur erhöhten endothelialen Expression von Leukozytenadhäsionsmolekülen. Hierbei handelt es sich vor allem um interzelluläre vaskuläre Adhäsionsmoleküle (ICAM-1: "intercellular adhesion molecule 1"/ VCAM-1: "vascular cell adhesion protein 1"). Außerdem werden E- und P-Selektin vermehrt

exprimiert, die im thrombotischen Geschehen eine wichtige Rolle bei der Leukozytenadhäsion spielen^{90, 126, 156}. Im Vergleich dazu stellt Interleukin 10 (IL10), hauptsächlich gebildet von Monozyten/Makrophagen und T_H2-Lymphozyten, den anti-inflammatorischen Gegenpart dar¹⁰⁰. Es terminiert inflammatorische Prozesse, hemmt die Makrophagenfunktion und reguliert das Wachstum und die Differenzierung von B-Zellen, NK-Zellen, zytotoxischen T-Zellen und T-Helferzellen, Granulozyten und Endothelzellen¹⁰⁰.

Angiogenese

Unter anderem sind Endothelzellen auch in der Lage bestimmte Wachstumsfaktoren von zu bilden, wie zum Beispiel den Endothelwachstumsfaktor A (VEGF A: "vascular endothelial growth factor A") und den transformierenden Wachstumsfaktor beta (TGF- β : "transforming growth factor beta"). Diese Faktoren beeinflussen vor allem die Rekanalisation und Wiederherstellung der Gefäßfunktion. Versuche mit verschiedenen endothelialen Zelllinien zeigten eine Stimulation der Ausschüttung von VEGF bei Hypoxie. Allgemein fördert dieser Wachstumsfaktor die Migration und Teilung von Endothelzellen beziehungsweise ihrer aus dem Knochenmark stammenden endothelialen Vorläuferzellen (EPC: "endothelial progenitor cells")^{90, 140}. Desweiteren beeinflusst der Wachstumsfaktor TGF- β vor allem die Migration und Proliferation von Fibroblasten^{90, 126, 156}.

1.4 Entstehung einer venösen Thrombose

Virchow-Trias der Thrombosebildung

Rudolph Virchow beschrieb bereits im Jahre 1855 die drei wichtigsten Faktoren, die zur Entstehung einer Thrombose führen⁵. Zum einen können Endothelschäden und Gefäßwandläsionen als Ursache festgelegt werden, zum anderen führen Strömungsverlangsamung, Wirbelbildung oder Stase, allgemein bezeichnet als "Störung im Blutfluss", zum Entstehen eines Thrombus. Der dritte Faktor ist die gesteigerte Neigung zur Blutgerinnung, auch Hyperkoagulabilität genannt.

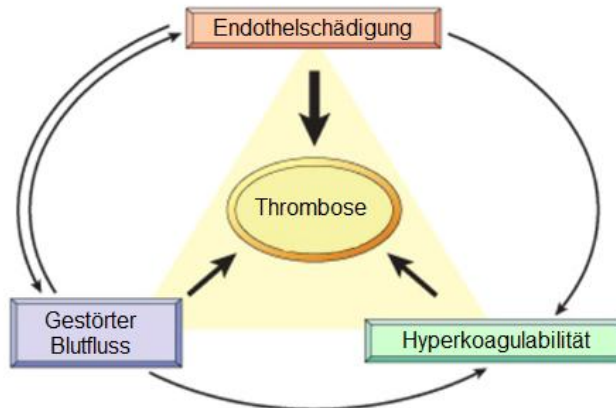


Abbildung 2: Virchow-Trias der Thrombosebildung.

Die Abbildung zeigt die drei hauptsächlichen Einflussfaktoren auf die Entstehung einer venösen Thrombose. Der wichtigste thrombogene Faktor ist hierbei die Endothelschädigung, da diese gleichzeitig einen Einfluss auf den Blutfluss und die Koagulationsbereitschaft besitzt. (Modifiziert nach⁹⁰)

Endotheldefekte können bedingt sein durch traumatische Ereignisse; hierzu zählen Operationen, Frakturen sowie Quetschungen. Auch entzündliche Prozesse nach Infektionen, immunpathologischen Reaktionen und Neoplasien führen zu Veränderungen des Endothels. Insbesondere die Exposition von Thromboplastin, welches bei Schädigung des intakten Endothels freigesetzt wird, ist ein wirksamer Stimulus der Thrombozytenaggregation. Eine endotheliale Dysfunktion kann zum Verlust der antikoagulatorischen Eigenschaften des Endothels führen; somit muss eine Thrombusbildung nicht unbedingt durch eine Schädigung des Endothels hervorgerufen werden.

Oftmals ruft eine reduzierte Funktionalität der Muskelpumpe eine Verlangsamung des venösen Blutflusses (Stase) in Richtung Herz hervor. Dies kann bedingt sein durch Immobilisation nach Operationen, Bettlägerigkeit oder auch aufgrund eines Bewegungsmangels, wie es bei Langstreckenflügen der Fall ist¹³⁵. Eine diskutierte Ursache besteht in der Annahme, dass die Verlangsamung des Blutstromes zu hypoxischen Zuständen im Gefäß führt, was eine Dysfunktion des Endothels zur Folge haben kann⁸². Die dadurch gesteigerte Expression seinerseits von P-Selektin und Freisetzung des von-Willebrand Faktors (vWF) aus den in Endothelzellen

enthaltenen Weibel-Palade-Körperchen hat eine Steigerung der Leukozyten- und Thrombozytenadhäsion zur Folge, was schlussendlich zur Stimulation der Entstehung eines venösen Thrombus führt¹⁵⁵.

Eine Hyperkoagulabilität besteht meist aufgrund genetischer Defekte. So stellen genetisch bedingte Thrombophilien, Defekte in der natürlichen Antikoagulation und Fibrinolyse, wie zum Beispiel Mangel an Antithrombin III und Protein C/ Protein S (Faktor V Leiden), ein verstärktes Risiko für das Auftreten einer Thrombose dar¹⁴.

1.5 Komplikationen im weiteren Verlauf einer venösen Thrombose

Die Entstehung eines venösen Thrombus im menschlichen Organismus ist in den meisten Fällen ein Prozess, der trotz Aufklärung von Risikofaktoren und vorsorglich therapeutischen Maßnahmen nicht immer zu verhindern ist. In diesem Zusammenhang können Komplikationen auftreten, die sich in einer Lungenembolie äußern oder im weiteren Verlauf das Auftreten eines postthrombotischen Syndroms hervorrufen. Beide Komplikationen erfordern ein schnelles Auflösen des Thrombenmaterials, um die Wiederherstellung der physiologischen Gegebenheiten im Gefäß zu gewährleisten.

1.5.1 Lungenembolie

Löst sich Thrombenmaterial von der Entstehungsstelle, so kann dies über die Zirkulation in andere Gewebe abgeschwemmt werden. Gerinnsel bleiben schließlich in Gefäßen mit kleinem Durchmesser hängen, wobei es sich im venösen Bereich vor allem um Venolen und Kapillaren des Lungenkreislaufs handelt. Mögliche Folgen sind Lungeninfarkte und Rechtsherzversagen. In circa 70% der Fälle sind Becken- oder Beinvenenthrombosen der Auslöser einer venösen Thromboembolie¹³⁰. Das Ausmaß der Erkrankung wird durch die Embolusgröße bestimmt. So sind kleine Thromben meist pathologisch unbedeutend, da sie durch das fibrinolytische System rasch abgebaut werden können⁹⁰. Die klinischen Symptome können sich sehr unspezifisch darstellen und reichen von Dyspnoe oder Tachypnoe über Thoraxschmerzen bis hin zum Auftreten von Synkopen¹⁴⁷. Therapeutische Maßnahmen bestehen in der Antikoagulation des Patienten, sofern keine Kontraindikationen vorliegen. Bei hämodynamisch instabilen Patienten wird zusätzlich zur therapeutischen Antikoagulation eine Thrombolyse durchgeführt¹⁴⁸.

1.5.2 Postthrombotisches Syndrom (PTS)

Ein postthrombotisches Syndrom (PTS) entsteht als Folge einer tiefen Bein- oder Beckenvenenthrombose. Ursächlich bedingt durch eine Schädigung des Gewebes und des Klappenapparates kommt es zu Obstruktionen und Strömungsinsuffizienzen. Als Resultat entsteht eine dynamisch venöse Hypertonie mit vermehrtem Blutvolumen in dieser Extremität¹⁶². Die Patienten neigen zu Schwellungen der unteren Extremitäten und je nach Grad der Schädigung können massive trophische Störungen auftreten. Schätzungsweise leiden derzeit 5% der gesamten Bevölkerung an einem postthrombotischen Syndrom^{128, 162}. Im klinischen Verlauf können drei Stadien unterschieden werden, das postthrombotische Frühsyndrom, das postthrombotische Syndrom und das postthrombotische Spätsyndrom. Der Übergang von der akuten Thrombose in das Stadium des postthrombotischen Frühsyndroms erfolgt meist 3 bis 4 Wochen nach Krankheitsbeginn und endet nach circa 12 Monaten. In den beiden letzten Phasen sind die Anpassungsvorgänge des Gewebes abgeschlossen, es kommt weiterhin zu Schwellungen und durch den Defekt der Venenklappen können Krampfadern, sogenannte Varikosen entstehen. In seltenen Fällen kann eine *Claudicatio venosae* auftreten. Dabei handelt es sich um belastungsbedingte Schmerzzustände in der betroffenen Extremität, hervorgerufen durch den verminderten Abfluss des venösen Blutes.

Rekanalisation des Thrombus und Kollateralisation zählen zu den wichtigsten körpereigenen Kompensationsmechanismen. Eine vollständige Rekanalisation kommt in 35,5% der Fälle vor⁵⁰. Bei ungenügender Rekanalisation steigt der Venendruck und führt so zur Stimulation der Bildung von Kollateralgefäßen. Diese sind vollständig funktionsfähig und besitzen eine optimal kompensierende Wirkung⁵⁰.

Die Auflösung des Thrombenmaterials sowie die Fibrosierung der Gefäßwand sind entscheidende Kriterien bei der Behandlung eines PTS. Im Verlauf spielen inflammatorische Prozesse, welche abhängig sind von der Einwanderung von Entzündungszellen und der Freisetzung von Zytokinen/Chemokinen, eine entscheidende Rolle³. Mit Hilfe von Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass durch eine Depletion von Interleukin 6 die Diapedese von monozytären Zellen aus der Blutbahn und die Bildung von CCL2/MCP-1 ("CC-Chemokin-Ligand-2" / "Monozyten-chemotaktisches Protein 1") reduziert werden konnten. Dies führte zu

einer verminderten Fibrosierung und verringerten Gefäßwanddicke im Entzündungsprozess¹⁶¹. Dennoch sind die zellulären und molekularen Mechanismen im Zusammenhang mit der Auflösung von Thrombenmaterial und Venenwandfibrosierung noch nicht vollständig aufgeklärt¹⁹.

Die Behandlungsmöglichkeiten reduzieren sich meist auf Kompressionstherapie, physikalische Maßnahmen und die Gabe von Antikoagulantien¹⁶². Daher ist es wichtig, die zugrunde liegenden biologischen Mechanismen weiter zu erforschen, um neue effektive Behandlungsmöglichkeiten zu finden¹¹⁶.

1.6 Natürliche Thrombenauflösung

Die Auflösung des entstandenen Thrombenmaterials und die Wiederherstellung der physiologischen Gefäßfunktion ist mit den Prozessen im Rahmen der Wundheilung vergleichbar^{58, 156}. Wie kompliziert sich dieser Prozess gestaltet, ist ausschließlich von der Größe des vorhandenen Thrombus abhängig. Ein kleiner, nicht okklusiver Thrombus kann somit einfach durch das fibrinolytische System beseitigt werden. Bei der Fibrinolyse handelt es sich um den proteolytischen Abbau des im Gerinnsel vorhandenen Fibrins durch die Serinprotease Plasmin. Diese Protease entsteht durch enzymatische Spaltung von Plasminogen, welches bereits bei der Gerinnselbildung im Fibrinnetz vorhanden ist³¹. In diesem Zusammenhang spielen tPA und Urokinase (uPA; "Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator") bei der Aktivierung von Plasmin die hauptsächliche Rolle im Prozess der Fibrinolyse¹⁴¹. Die Deletion der Urokinaseaktivität im Mausmodell zeigte eine schlechtere Auflösung des venösen Thrombus über einen Zeitraum von 21 Tagen. Im Gegensatz dazu ergab die Deletion von PAI-1 eine verbesserte Thrombenauflösung im gleichen Zeitraum, jedoch eine stärkere Fibrose der Venenwand⁶.

Bei größeren oder schon länger bestehenden Thromben erfolgt in den meisten Fällen die Aufnahme des Thrombenmaterials in die Gefäßwand. In diesem als Organisation bezeichneten Prozess spielen Makrophagen eine bedeutende Rolle. Sie phagozytieren Debris und im weiteren Verlauf kommt es zur Bildung von Granulationsgewebe, was zur Fibrosierung der betroffenen Stelle führt. Durch Reendothelialisierung des Narbengewebes wird dieser Prozess abgeschlossen⁹⁰.

Handelt es sich um einen okklusiven Thrombus, der nicht durch Fibrinolyse und den Einsatz von Makrophagen beseitigt werden kann, so schließt sich dem Prozess der

Organisation eine weitere Phase der Rekanalisation an. Durch die Bildung neuer Gefäßkanäle soll somit der Blutfluss im betroffenen Abschnitt wieder hergestellt werden⁹⁰. Im Allgemeinen ist die Thrombenauflösung ein inflammatorischer Prozess, in dem nicht nur Leukozyten, sondern auch Zytokine und Chemokine eine Rolle spielen. Es kommt in der Regel zu Veränderungen der Gefäßwand im betroffenen Abschnitt. In diesem Zusammenhang können den profibrotischen Wachstumsfaktoren und den Matrixmetalloproteinasen eine essentielle Funktion zugesprochen werden^{22, 57, 156}.

1.7 Mausmodelle der venösen Thrombose

Die Maus als Modellorganismus weist gerade im Hinblick auf die Verwendung von verschiedenen knockout-Linien noch weitere Vorteile, bezogen auf die Vergleichbarkeit zum menschlichen Organismus auf. So ergeben sich aus dem Speziesvergleich zwischen Mensch und Maus einige Parallelen, wie z. B. die initiale Infiltration von inflammatorischen Zellen wie neutrophilen Granulozyten und Monozyten, im weiteren Verlauf der Abbau von Fibrin und Erythrozyten, außerdem die Bildung von Kollagen, sowie die Retraktion des Thrombus und die Bildung von neuen, infiltrierenden vaskulären Kanälen im Thrombengewebe^{35, 98, 99, 156}. Für die Beobachtung von thrombotischen Prozessen im Mausmodell gibt es mehrere in der Literatur beschriebene Durchführungsmöglichkeiten. Zum einen können kleine Gefäße, wie beispielsweise Mesenterialvenen, verwendet werden^{20, 121}. In diesen Gefäßen werden meist akut thrombogenetische Prozesse analysiert, während sowohl für akute als auch chronische Stadien der Thrombose die *Vena cava caudalis* hauptsächlich Verwendung findet^{25, 55, 61, 108, 110}. Diese besitzt durch ihre Größe vor allem den Vorteil, mehr Material für spätere Analysen gewinnen zu können. Beim murinen Thrombosemodell unter Verwendung der *Vena cava caudalis* gibt es die Induktion eines Thrombus betreffend laut Literatur folgende Möglichkeiten:

- Induktion durch Eisen-III-Chlorid
- Induktion durch elektrolytische Stimulation
- *Vena cava caudalis* Stasis- oder Ligations-Modell
- *Vena cava caudalis* Stenose Modell

1.7.1 Induktion durch Eisen-III-Chlorid

Auf die freigelegte Vene wird ein Filterpapierplättchen, getränkt mit 3,5% Eisen-III-Chloridlösung, aufgebracht und nach 2-3 Minuten wieder entfernt. Die herbeigeführte oxidative Schädigung der Gefäßwand resultiert innerhalb weniger Minuten in der Entstehung von okkludierenden Thromben. Die Schnelligkeit der Thrombusinitiation und die Größe der entstehenden Thromben kann durch die Variation der Eisen-III-Chloridkonzentration (3-20% Eisen-III-Chlorid) und der Expositionszeit beeinflusst werden^{1, 25, 66}. Dieses Modell wird hauptsächlich für akut thrombogenetische Studien verwendet. Leider spiegelt es nicht die Mehrzahl an klinisch auftretenden tiefen Venenthrombosen wieder⁸⁷.

1.7.2 Induktion durch elektrolytische Stimulation

Ein mit Silber überzogener Kupferdraht, gekoppelt an eine 25 Gauge-Nadel, wird im subkutanen Bindegewebe und in der kaudalen *Vena cava caudalis* platziert. Mit einer Stromstärke von 250 μ Amp über einen Zeitraum von ca. 15 Minuten wird die Entstehung freier Radikale gefördert, die eine Endothelaktivierung zur Folge haben^{17, 24, 26}. Laterale venöse Seitenäste, die in diesem Bereich in die *Vena cava* münden, werden ligiert. Die Blutzirkulation wird nicht beeinflusst, es kommt zu einer minimalen Endothelverletzung am Ort der Einstichstelle. Der Thrombus wächst mit dem Blutstrom und die totale Okklusion des Gefäßes bleibt aus²⁴. Verglichen mit den anderen Modellen können hier sowohl akute als auch chronische Stadien der venösen Thrombose verfolgt werden²⁵. Der apparative und zeitliche Aufwand kann oftmals limitierender Faktor bei der Verwendung dieses Modelles sein.

1.7.3 *Vena cava caudalis* Stasis oder Ligations-Modell

Eine im Gefäß herbeigeführte Stase wird durch vollständige Ligation der *Vena cava caudalis* im Bereich unterhalb der Nierenvene erreicht^{6, 56}. Die in die *Vena cava* mündenden Seitenäste werden lateral zusätzlich ligiert und teilweise *posterior* mit Hilfe eines Kauters verschlossen¹⁶³. Dieses Modell spiegelt die totale Okklusion des Gefäßes im klinischen Szenario wieder. Die Thrombengröße ist relativ konstant, dennoch ist der durch die totale Ligation entstandene Endothelschaden nicht zu vernachlässigen. Dieses Modell kann zur Untersuchung akuter sowie chronischer Prozesse verwendet werden, wobei der Schwerpunkt mehr auf Beobachtung von chronischen Stadien mit Analyse der Rekanalisation und Thrombenauflösung liegt²⁵.

1.7.4 *Vena cava caudalis* Stenose Modell

Wie beim IVC-Stasis Modell erfolgt eine Ligation unterhalb der Nierenvenen, jedoch wird hier durch die Nutzung eines Platzhalters, welcher im Verlauf der Prozedur wieder entfernt wird, nur eine Stenose geschaffen die einen um ca. 80% verminderten Blutfluss garantiert. Nach Brühl et al. (2012), kommt es zu keinem nennenswerten Endothelschaden im Bereich der Ligaturstelle¹⁵⁵. In der Literatur werden zu diesem Modell noch verschiedene Modifikationen beschrieben. Hierzu zählt die Nutzung eines vaskulären Clips, der zusätzlich zur Reduzierung der Flussgeschwindigkeit eine Endothelschädigung hervorruft²⁵. Des Weiteren gibt es in dieser Modellvariante noch bestehende Modifikationen bezüglich der Gefäßseitenäste, die in die *Vena cava* münden^{23, 109}. Einige Autoren verschließen die sichtbaren, lateral der *Vena cava* liegenden Äste mit einer vollständigen Ligatur, die posterioren Äste bleiben jedoch unangetastet. Das Ziel dieser Modifikation ist es, eine konstantere Thrombusbildung zu gewährleisten. Ein großer Nachteil dieses Modells ist die ausgeprägte Variation in der Thrombengröße; einige Mäuse entwickeln nach erfolgreicher Operation keinen Thrombus^{11, 23}.

Zusammenfassend kann die *Vena cava* Ligatur mit Induktion einer Stenose ohne jegliche Modifikationen die tiefe Venenthrombose im menschlichen Organismus am besten nachahmen²⁵. Wie schon in Kapitel 1.4 beschrieben, kommt es im menschlichen Organismus hauptsächlich aufgrund einer verlangsamten Strömung und Hyperkoagulabilität zum Entstehen eines venösen Thrombus^{14, 82}. Demnach bringt das *Vena cava* Stenose Modell mit der hervorgerufenen Reduktion des Blutflusses, ohne Schädigung des Endothels, die besten Voraussetzungen mit, um die Thrombusentstehung und Thrombusauflösung im Mausmodell zu untersuchen¹¹.

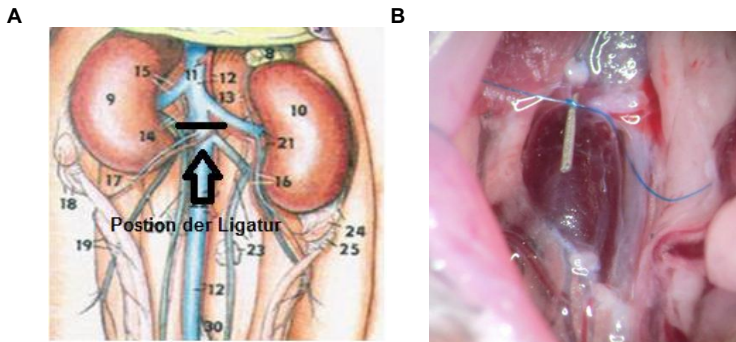


Abbildung 3: Anatomische Darstellung der abdominalen venösen Gefäße der Maus/Platzhalterposition im Stenose Modell der Vena cava caudalis.

A: Anatomische Darstellung der venösen Gefäße im abdominalen Bereich der Maus. Im Stenose Modell erfolgt zur Induktion einer venösen Thrombose das Setzen einer Ligatur unterhalb der linken Nierenvene. (Modifiziert nach ⁵⁴)

B: *In situ* Darstellung der durchgeführten Ligatur unterhalb der linken Nierenvene mit eingebrachtem Platzhalter, welcher nach Beendigung der Ligatur wieder vollständig entfernt wird, um eine Stenose in diesem Bereich hervorzurufen (Bild aus eigener Quelle).

2. Einfluss inflammatorischer Zellen im Geschehen der venösen Thrombose

2.1 Leukozyten

Wie mehrfach in der Literatur durch histologische Schnitte bestätigt, repräsentieren die Leukozyten, die auch als weiße Blutzellen (gr. *leukos* = weiß) bezeichnet werden, einen bedeutenden Bestandteil des thrombotischem Materials im venösen System^{58, 113, 155}. Innerhalb der Leukozytenpopulation lassen sich anhand ihrer Morphologie und Anfärbbarkeit verschiedene Typen von Zellen unterscheiden. So kann man im Blutaussstrich Monozyten, Lymphozyten und Granulozyten differenzieren, wobei sich die Granulozyten je nach Affinität der Granula zu basischen bzw. sauren Farbstoffen der Pappenheim-Färbung in neutrophile, eosinophile und basophile unterteilen lassen⁸³.

Leukozyten sind für die angeborene und erworbene Immunabwehr verantwortlich und nur zu $\leq 5\%$ ihrer Gesamtzellzahl im Blut nachweisbar. Der restliche Anteil befindet sich vorwiegend im Knochenmark, der hauptsächlichen Bildungsstätte der Leukozyten, oder in anderen lymphatischen Organen, wie Thymus, Milz und Lymphknoten. Bei einem akuten Entzündungsreiz sind sie in der Lage, in beliebige Gewebe zu gelangen⁸⁴. Obwohl das Blut lediglich als Transportmittel genutzt wird,

spiegelt die Anzahl der im Blutstrom vorhandenen Leukozyten annähernd die Reaktionslage des Abwehrsystems wieder³¹. Je nach prozentualer Verteilung der verschiedenen Zellpopulationen im Differentialblutbild können granulozytäre von lymphozytären Blutbildern unterschieden werden. Im Vergleich zum granulozytären humanen Differentialblutbild finden sich im murinen Blut mehr als 50% Lymphozyten, weswegen man in diesem Fall von einem lymphozytären Blutbild spricht (Tab. 1).

Tabelle 1: Vergleichende Darstellung des differentiellen Blutbildes von Mensch und Maus (Modifiziert nach ³¹)

	Mensch	Maus
Gesamtzahl Leukozyten/ μl	3000 - 11000	4000 - 12000
Neutrophile Granulozyten %	57 - 70	20 - 30
Eosinophile Granulozyten%	2 - 4	3 - 5
Basophile Granulozyten %	0 - 1	0 - 1
Lymphozyten %	20 - 30	40 - 60
Monozyten %	5 - 7	3 - 5
Blutbild \Rightarrow	granulozytär	lymphozytär

2.1.1 Monozyten/Makrophagen

Die Monozyten sind mit einer Größe von 14 - 20 μ m die größten Leukozyten. In der Pappenheim-Färbung zeigen sich das Zytoplasma blass blaugrau und der Kern nierenförmig eingebuchtet. Sie zirkulieren in der Regel für 1-3 Tage im Gefäßsystem und wandern dann per Diapedese in das Gewebe aus, um sich dort weiter zu Makrophagen zu differenzieren. Hierbei unterscheidet man Makrophagen, die in bestimmten Organen und Geweben „beheimatet“ sind (Gewebsmakrophagen) von Makrophagen, die sich erst auf einen akuten Entzündungsreiz hin aus Monozyten entwickeln. Entzündungsmediatoren wie Chemokine veranlassen dabei diese Monozyten, den Blutkreislauf zu verlassen, um in den Bereich der Entzündung einzuwandern.

Monozyten und Makrophagen sind Bestandteile des mononukleären Phagozytensystemes (MPS) und stellen einen Teil der unspezifischen Immunabwehr dar. Zu ihren Aufgaben gehören die Phagozytose von Krankheitserregern, die Zytokinfreisetzung sowie die Antigenpräsentation und Regulation der T-Zell-Aktivität.

Prinzipiell gehören Monozyten/ Makrophagen zum angeborenen Immunsystem, sind jedoch auch durch die Fähigkeit der Antigenpräsentation an der erworbenen Immunantwort beteiligt. Eine wichtige Stellung besitzen sie auch im Rahmen chronischer Entzündungsprozesse. Hierbei besitzen sie oftmals eine gewebs-schädigende Wirkung, welche durch die Freisetzung toxischer Sauerstoffmetaboliten und Proteasen hervorgerufen wird. Monozyten entwickeln sich aus pluripotenten Stammzellen im Knochenmark. Diese Differenzierung läuft sehr schnell ab und benötigt nur eineinhalb bis drei Tage^{31, 83, 84, 90}.

2.1.2 Neutrophile Granulozyten

Die neutrophilen Granulozyten sind die Hauptvertreter der unspezifischen Immunabwehr. In der Pappenheim-Färbung stellen sie sich als 10-12 µm große Zellen dar und weisen einen Kern auf, der aus 3-4 Segmenten besteht. Sie gehören zu den Zellen, die am schnellsten zum Entzündungsherd vordringen können (15 µm/min)⁸⁴. Ihre Hauptfunktion besteht in der Abtötung von Bakterien; hierzu enthalten die in der Zelle vorhandene Granula lysosomale Enzyme und sind auch in der Lage, toxische Sauerstoffverbindungen zu bilden. Eine weitere Funktion besteht darin, Zell- und Gewebstrümmer zu phagozytieren. Allgemein besitzen sie eine kurze Lebensdauer, welche im Interstitium maximal drei Tage beträgt. Haben diese Zellen Partikel phagozytiert, so sterben sie meist noch am Infektionsort ab⁹⁰.

Die Granula der neutrophilen Granulozyten enthalten zusätzlich zu Lysozym und Myeloperoxidase auch Elastasen und Kollagenasen⁸³. Diese Enzyme können nach Freisetzung Schädigungen von umliegenden Geweben hervorrufen, was vor allem im Prozess der Phagozytose passiert. Auch die neutrophilen Granulozyten werden, wie die Monozyten, aus pluripotenten Stammzellen im Knochenmark gebildet. Zusätzlich zu den im Blut zirkulierenden Zellen gibt es zwei Reserveeinheiten: zum einen den marginalen Pool, das heißt neutrophile Granulozyten, die dem Endothel großer Venen lose anhaften sowie die Knochenmarkreserve. Hierbei handelt es sich um fast reife (stabkernige) und reife (segmentkernige) Granulozyten in ungefähr der zehnfachen Menge der Blutgranulozyten. Bei Bedarf kann somit die Anzahl an zirkulierenden neutrophilen Granulozyten rasch erhöht werden^{31, 83}.

2.1.3 Lymphozyten

Funktionell kann man drei verschiedenen Populationen von Lymphozyten unterscheiden. Bei ca. 15% der zirkulierenden Lymphozyten handelt es sich um B-Lymphozyten, ca. 75% repräsentieren T-Lymphozyten und Natürliche Killerzellen kommen zu ca. 10% vor. Im Blutausschlag sind diese Zellen ca. 4-15 μm groß, besitzen einen runden, chromatinreichen Kern und einen recht schmalen Zytoplasmasaum⁸³.

Allgemein zählen die Lymphozyten zu den Trägern der erworbenen Immunantwort, und werden der humoralen (B-Lymphozyten) bzw. zellvermittelten Immunabwehr (T-Lymphozyten) zugeordnet. Nach Antigenstimulation differenzieren sich B-Lymphozyten zu sogenannten Plasmazellen, welche am rauen endoplasmatischen Retikulum Antikörper (=Immunglobuline) bilden, die dann über die Zellmembran abgegeben werden. Diese Antikörper dienen der Neutralisation von Antigenen, der Markierung von Fremdsubstanzen (Opsonisierung) und der Komplementaktivierung^{31, 84}.

Die zellvermittelte Immunantwort wird von den T-Lymphozyten bewerkstelligt. Diese können weiter differenziert werden in T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen. Sie exprimieren einen spezifischen Rezeptor (engl. T-cell receptor; kurz TCR), mit dem sie in der Lage sind, kleine Peptidbruchstücke zu erkennen, die an sogenannte MHC-Moleküle (Haupthistokompatibilitätskomplex; engl. major histocompatibility complex) präsentierender Zellen gebunden sind^{31, 42}. Man unterscheidet MHC-I Komplexe, die auf allen kernhaltigen Zellen im Organismus vorkommen, von MHC-II Komplexen, welche auf antigenpräsentierenden Immunzellen (Makrophagen, dendritische Zellen und B-Lymphozyten) zu finden sind. Zusätzlich zum TCR können die T-Lymphozyten über CD-Oberflächenrezeptoren (Unterscheidungsgruppen; engl. "cluster of differentiation") differenziert werden⁷². Kennzeichnend ist für T-Helferzellen der CD4 Rezeptor, welcher hauptsächlich mit MHC-II Komplexen interagiert und zur Vermehrung und Differenzierung der Zellen zu Effektorzellen und Gedächtniszellen führt. Je nach Zytokinprofil am Entzündungsort werden Typ 1 oder Typ 2 T-Helferzellen (T_H1 / T_H2) gebildet, die sich wiederum anhand der von ihnen ausgeschütteten Zytokinmuster unterscheiden lassen¹⁶⁹. Zytotoxische T-Zellen besitzen CD8 als Co-Rezeptor und interagieren mit MHC-I Komplexen. Durch die Sezernierung von Perforinen und Granzymen wird die Zielzelle eliminiert⁸³.

Natürliche Killerzellen besitzen eine unspezifische toxische Wirkung. Dies bedeutet, dass sie keine MHC-Restriktion in der Antigenerkennung besitzen⁹⁰. Sie sind in der Lage, Tumorzellen und virusbefallene Zellen wie die zytotoxischen T-Zellen durch die Freisetzung von Granzymen und Perforinen zu zerstören.

Allgemein findet die Bildung und Reifung von lymphoiden Stammzellen im Knochenmark statt, nur T-Lymphozyten durchlaufen einen weiteren Selektionsprozess im Thymus. Solange diese Zellen noch keinen Kontakt zu Antigenen hatten, werden sie als naive (ungeprägte) Lymphozyten bezeichnet. Sie zirkulieren zwischen Blut, den peripheren lymphatischen Geweben weiter über die Lymphflüssigkeit und Milz bis sie wieder den Blutstrom erreichen⁶⁵. Auch bei chronischen Entzündungsprozessen, wie Autoimmunerkrankungen und Krankheiten mit Antigenpersistenz, spielen Lymphozyten eine wichtige Rolle. Wie Makrophagen können sie, stimuliert durch Chemokine und Zytokine, innerhalb von 24-48 Stunden zum Entzündungsherd gelangen⁹⁰.

T_H1- und T_H2-Immunantworten

Ein wichtiger Bestandteil dieses Systems sind CD4 positive T-Lymphozyten oder auch T-Helferzellen genannt. Sie beeinflussen durch das von ihnen ausgeschüttete Zytokinmuster, welcher Typ der Immunantwort induziert wird. Die Bezeichnung T_H1 und T_H2 bezeichnet dabei die Kategorisierung der immunologischen Reaktion⁹⁰.

T_H1-vermittelte Immunantworten treten vor allem im Zusammenhang mit intrazellulären Pathogenen auf¹⁶⁹. Initiatoren dieser Antwort sind antigenpräsentierende Zellen, wie vor allem dendritische Zellen, Monozyten und Makrophagen, eingeschränkt auch B-Lymphozyten⁵¹. In diesem Zusammenhang spielen die Zytokine Interferon gamma (Ifn γ) und IL12 in der Differenzierung von naiven CD4 positiven Lymphozyten zu T_H1 Zellen eine bedeutende Rolle⁹⁶. Ist die Differenzierung abgeschlossen, so produzieren diese Zellen hauptsächlich IL2, Ifn γ und den Tumornekrose-Faktor beta (TNF- β)^{65, 169}. Allgemein führt die Ausschüttung dieses Zytokinmusters vornehmlich zur Aktivierung von Makrophagen und dient somit der Förderung mikrobizider Aktivität gegen extra- und intrazelluläre Antigene. T_H2 Immunantworten finden sich häufig bei chronischen Entzündungsreaktionen mit allergischem Hintergrund, wie es beispielsweise bei Asthma der Fall ist¹⁴⁹. Diese Immunantwort ist vor allem mit der Freisetzung von IL4, IL5 und IL10 aus T_H2-Zellen

verbunden, welche im Gegensatz zur Freisetzung von $\text{Ifn}\gamma$ die Makrophagenaktivität hemmen und die Antikörperproduktion in B-Lymphozyten stimulieren (humorale Immunität)^{90, 96, 169}. Wird im Verlauf der Immunantwort eine bestimmte Untergruppe der CD4-Zellen zuerst aktiviert, so kann sie die Entwicklung der jeweils anderen unterdrücken⁶⁵. So verhindert beispielsweise IL10 die Differenzierung von $\text{T}_{\text{H}1}$ Zellen und $\text{Ifn}\gamma$ die Differenzierung von $\text{T}_{\text{H}2}$ Zellen. Da das Gleichgewicht zwischen $\text{T}_{\text{H}1}$ und $\text{T}_{\text{H}2}$ Zellen von Zytokinen abhängt, lässt sich die iatrogene Stimulierung der jeweiligen Antwort als mögliches Therapeutikum einsetzen.

Ein wichtiger Aspekt in diesem Zusammenhang ist die Differenzierung von Makrophagen in M1- oder M2-Zellen. Nach Einwanderung der Monozyten in das betroffene Gewebe differenzieren sich diese zu Makrophagen. Innerhalb dieser Makrophagenpopulation können zwei verschiedene Typen unterschieden werden. M1-Makrophagen auch als klassisch aktivierte Makrophagen bezeichnet stellen den Typ inflammatorischer Makrophagen dar. Die M2-Makrophagen auch als alternativ aktivierte Makrophagen bezeichnet verkörpern mehr den antiinflammatorischen Typ¹⁰⁴. M1- und M2-Makrophagenaktivität kann durch die Freisetzung von T_{H} -immunvermittelten Zytokinen erhöht werden, jedoch bestimmt die Differenzierung der Makrophagenpopulation die jeweilige Immunantwort und nicht umgekehrt⁹⁴. M1-Makrophagen befinden sich im Abwehrmodus; diese Population zeichnet sich durch die Produktion von NO (Stickstoffmonoxid) aus. M2-Makrophagen bedienen vermehrt eine Reparaturfunktion und das in diesen Zellen vermehrt vorkommende Enzym Arginase I unterstützt die Bildung von Ornithin und Harnstoff aus der Aminosäure Arginin. Vor allem Ornithin als Vorläufer von Polyaminen und wichtige Aminosäure des Kollagens besitzt eine bedeutende Funktion im Rahmenn von Proliferations- und Reparaturmechanismen^{95, 164}.

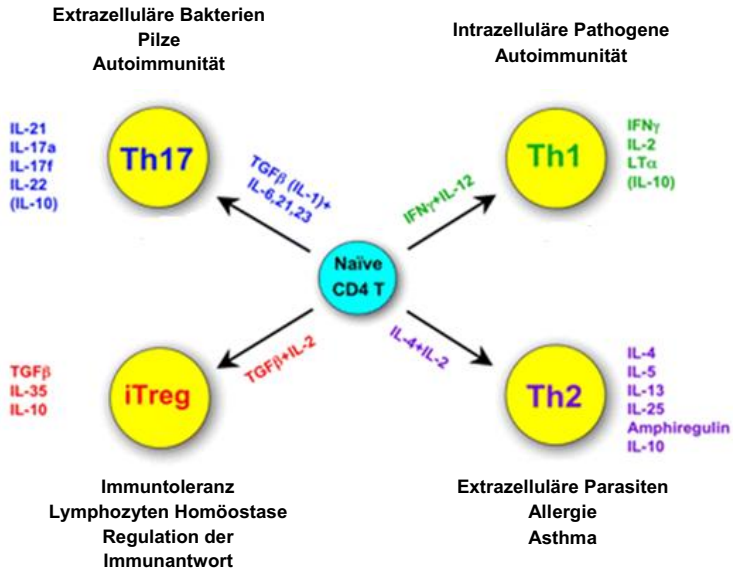


Abbildung 4: Differenzierungsmöglichkeiten von naiven CD4-Zellen.

Es gibt vier verschiedene Möglichkeiten, wie sich eine naive CD4-positive Zelle weiter differenzieren kann. Eine Stimulation mit Interferon gamma (Ifnγ) und Interleukin 12 (IL-12) führt zur Differenzierung der naiven CD4-Zelle zu einer Th1-Zelle, welche sich durch ein Zytokinmuster von Ifnγ, Interleukin 2, Interleukin 10 und Lymphotoxin α (LTα) auch als Tumor-Nekrose-Faktor beta (TNFβ) bekannt, auszeichnet. Die Interleukine 2 und 4 führen zur Differenzierung in eine Th2-Zelle, die wiederum für die Bildung spezieller Zytokinmuster verantwortlich ist. In diesem Zusammenhang zu nennen sind die Interleukine 4, 5, 10, 13, 25 und der Wachstumsfaktor Amphiregulin. Stimulieren die Interleukine 6, 21, 23, auch in manchen Fällen Interleukin 1 und der transformierende Wachstumsfaktor beta (TGFβ) naive CD4 positive Zellen, so kommt es zur Differenzierung in eine Th17 Zelle, die für die Bildung von Interleukin 17a, 17f, 21, 22 und teilweise auch Interleukin 10 verantwortlich ist. Eine Differenzierung zur induzierten regulatorischen T-Zelle (iTreg) wird durch TGFβ und Interleukin 2 stimuliert. Diese Zellen produzieren auch gleichzeitig TGFβ und die Interleukine 10 und 35. (Modifiziert nach¹⁶⁹)

2.2 Die Rolle der Leukozyten im Entstehungsprozess der venösen Thrombose

Obwohl die Wichtigkeit inflammatorischer Zellen im Entstehungsprozess venöser Thrombosen mehrfach beschrieben wurde, ist die genaue Rolle in diesem Geschehen noch nicht präzise aufgeklärt. Dabei konnte in den letzten Jahren insbesondere den Monozyten und neutrophilen Granulozyten ein essentieller

Einfluss im Mausmodell der venösen Thrombose zugesprochen werden. In diesem Zusammenhang konnten von Bruehl et al. (2012) mit Hilfe intravitalmikroskopischer Aufnahmen zeigen, dass bereits eine Stunde nach Stenosierung des venösen Gefäßes neutrophile Granulozyten und Monozyten, als vorrangige Zellpopulation, begannen, sich am Endothel des Gefäßes anzulagern¹⁵⁵. Dieser Prozess zeigte sich abhängig von Zelladhäsionsmolekülen wie den Selektinen (speziell P-Selektin) und führte zur Anlagerung der genannten Leukozytenpopulation. Eine Inhibierung der P-Selektin Expression reduzierte die Thrombusbildung^{32, 109}. Dieses Adhäsionsmolekül wird von Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen nach Aktivierung freigegeben. Die genauen Stimulationsfaktoren, die zu einer Freisetzung von P-Selektin führten, blieben jedoch weitgehend ungeklärt. Diskutiert werden hypoxische Zustände sowie veränderte shear-Stress Kräfte.

Monozyten

Diese Zellpopulation ist in der Lage, an ihrer Oberfläche TF (engl. „tissue factor“) zu exprimieren, welcher im weiteren Verlauf zur Aktivierung der extrinsischen Koagulationskaskade führt⁴³. Um die Koagulationskaskade zu aktivieren, bildet dieser Gewebefaktor mit den Faktor VIIa einen Komplex, der seinerseits zur Aktivierung von Faktor X zu Xa und somit zur Bildung von Prothrombinase führt. In Mäusen mit einer verminderten Thromboplastinexpression konnte gezeigt werden, dass es nicht zu einer Fibrinbildung im Gefäß kam und somit die Thrombusbildung ausblieb¹⁵⁵.

Neutrophile Granulozyten

Die neutrophilen Granulozyten nehmen in der frühen Entstehungsphase einer venösen Thrombose den größten Anteil an inflammatorischen Zellen ein^{113, 155, 156}. Durch eine Depletion dieser Zellpopulation konnte gezeigt werden, dass die Wahrscheinlichkeit der Thrombusbildung sinkt und diese Population nicht als hauptsächliche Quelle für die TF-Bildung in Frage kommt¹⁵⁵. Nach dem derzeitigen Kenntnisstand tragen neutrophile Granulozyten durch zwei verschiedene Mechanismen zur Entstehung einer venösen Thrombose bei. Zum einen können sie direkt Faktor XII binden und die intrinsische Gerinnungskaskade aktivieren, zum andern nehmen sie Einfluss durch die Freisetzung von sogenannten NETs, den „neutrophil extracellular traps“¹³³. Diese extrazellulär vorkommenden DNA-Protein-Strukturen führen ebenfalls zur Aktivierung von Faktor XII sowie zur

Thrombozytenstimulation über die Histone H3 und H4 und binden TF zur Aktivierung der extrinsischen Gerinnungskaskade^{39, 155}.

T-Zellen

Welchen Einfluss T-Zellen im Geschehen der venösen Thrombose spielen, ist bisher noch unklar. Die Untersuchung von histologischen Schnitten im Stenose Modell der venösen Thrombose zeigte kein vermehrtes Auftreten von Lymphozyten im frühen Stadium der Thrombosierung¹⁵⁵. Erstmals betrachteten Hish et al. (2014) das Vorhandensein von Lymphozyten im Venengewebe bei der Entstehung einer venösen Thrombose 6 und 48 Stunden nach Induktion. Ein Augenmerk dieser Studie lag auf dem Einfluss verschiedener postoperativ verwendeter Analgetika auf die Veränderung der Zellzusammensetzung (neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten) im venösen Gewebe⁵⁹.

Beschrieben wurde bisher eine erhöhte Neigung zu thrombotischen Prozessen bei Patienten mit chronischer lymphozytärer Leukämie¹⁸ und ein gesteigertes Thromboserisiko bei der Behandlung von lymphatischer Leukämie mittels des Immunmodulators Lenalidomid⁴.

2.3 Die Rolle von Leukozyten im Auflösungsprozess der venösen Thrombose

Die Tatsache, dass es in den verschiedenen Stadien des Auflösungsprozesses einer venösen Thrombose zu einer Verschiebung im Nachweis unterschiedlicher Leukozytenpopulationen kommt, spricht für deren möglichen Einfluss in diesem Geschehen^{113, 115}. Dabei sind die kausalen Zusammenhänge noch nicht weitreichend geklärt. Nosaka et. al. (2009) zeigten anhand von histologischen Analysen die Verteilung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen im venösen Thrombengewebe. Es ergab sich dabei eine stetige Abnahme der Zahl neutrophiler Granulozyten bis Tag 21 und ein maximaler Anstieg der Anzahl an Makrophagen im Thrombengewebe bis Tag sieben¹¹³. Die Mehrheit der Leukozyten bestand somit im frühen Stadium aus polymorphkernigen Leukozyten (PMNs) und erst im späteren Verlauf des Auflösungsprozesses dominierten die Makrophagen¹²⁶. Lymphozyten galten bisher als irrelevant für den Entstehungs- (s. Kap. 2.2) und Auflösungsprozess venöser Thromben.

Neutrophile Granulozyten

In der Literatur wird den neutrophilen Granulozyten ein antifibrinolytisches Potential zugeschrieben. Im Rahmen des Auflösungsprozesses sollte die Freisetzung von Plasminogen-Aktivatoren durch die im Thrombus enthaltenen Zellen zur spontanen Fibrinolyse führen. Außerdem wurde diesen Zellen durch ihre Produktion von angiogenetischen Mediatoren, wie beispielsweise VEGF, ein weiterer positiver Einfluss auf die Rekanalisation zugesprochen¹⁵¹. Insbesondere wurde in diesem Zusammenhang Interleukin 8 (IL8) während des Auflösungsprozesses des Thrombus als wichtiges proinflammatorisches Zytokin beschrieben¹⁵¹. Als durch Makrophagen und Endothelzellen gebildetes Zytokin führt IL8 zur gesteigerten Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten zum Zielort sowie zu einer gesteigerten Phagozytose.

Monozyten/ Makrophagen

Die Monozyten-/ Makrophagenpopulation spielt im späteren Auflösungsprozess eine entscheidende Rolle¹⁵⁶. Das Maximum an Zellen wird in der Literatur mit geringen Abweichungen zwischen Tag 6 und Tag 8 nach Induktion einer Thrombose beschrieben¹¹³. Ihre Anwesenheit korreliert mit erhöhten Werten von MCP-1, welches die Einwanderung und Aktivierung speziell von Monozyten ins betroffene Gewebe fördert⁶². Ali et al. (2006) konnten durch die gezielte Injektion von MCP-1 in das Thrombusgewebe eine schnellere Auflösung erzielen³. Bisher konnte die Funktion der Makrophagen im Thrombengewebe noch nicht vollständig geklärt werden. Ihnen wird eine fibrinolytische, proangiogenetische und gewebsmodulierende Funktion zugesprochen¹²⁶.

Inflammatorische Monozyten, die im Gefäßsystem zirkulieren, exprimieren auf ihrer Oberfläche Ly6C und werden in Gewebe rekrutiert, in denen ein Entzündungsprozess stattfindet⁴⁶. Ly6C als Epitop des Gr1-Rezeptors ist ein zusätzlicher Marker für in der Maus vorkommende CCR2 positive Monozyten^{29, 41}. Die Unterscheidung, ob die im Gewebe vorhandenen Zellen für Ly6C positiv oder negativ sind, scheint einen Einfluss auf den Auflösungsprozess des Thrombus zu besitzen. Eine verschlechterte Auflösung im Thrombose-Model der CCR2 knockout Maus könnte Hinweise auf die Rolle von Ly6C⁺ Makrophagen geben. Der „CC chemokine receptor type 2“ als Rezeptor für MCP-1 spielt nicht nur im Thrombengewebe eine Rolle. Seine Expression ist auch ein wichtiger Bestandteil bei der Rekrutierung Ly6C⁺

Zellen aus dem Knochenmark¹³⁹. Dennoch werden zudem Ly6C-negative Zellen im Verlauf einer Gewebsreparatur vermehrt gefunden. Diese modellieren besonders den Prozess der Gefäßneubildung und Kollagenablagerung, wie Willenborg et al. (2012) in einer dermatologischen Studie zeigen konnten¹⁶⁰.

T-Zellen

Die bisher publizierten Daten sprechen gegen einen Einfluß von Lymphozyten im Auflösungsprozess von venösen Thrombosen. Humphries et al. zeigten 2009 in Studien mit SCID- Mäusen (schwerer kombinierter Immundefekt; "severe combined immunodeficiency"), dass keine Unterschiede im Auflösungsprozess in einem Zeitraum von über drei Wochen festzustellen war⁶¹. Typisch für diese Mäuse ist eine gehemmte Entwicklung lymphoider Zellen und ein absoluter Mangel an ausgereiften, funktionellen B- und T-Lymphozyten¹⁰.

II. Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt sechs Themenkomplexe bearbeitet, welche nachfolgend kurz erläutert werden.

1. *Standardisierung und Evaluation der sonographischen Darstellung von venösen Thromben im Vena cava caudalis Stenose Modell*

Eine Untersuchung mittels Ultraschall soll Aufschluss geben über die Reproduzierbarkeit von Messdaten zur Erfassung der Thrombenlänge.

2. *Genauere Betrachtung des verwendeten Mausmodells und Darstellung des Einflusses venöser Seitenäste auf die Thrombenentstehung*

Bei der Verwendung des Modells der Vena cava Stenose bestehen Nachteile im Prozess der Entstehung und Vergleichbarkeit der Thrombengröße. Dies soll mit Hilfe der Ultraschalluntersuchung näher betrachtet werden, um vor allem den Einfluss der in der Vena cava caudalis vorhandenen lateralen und dorsalen Seitenäste zu klären.

3. *Evaluation der FACS-Analyse von Thromben- und Venengewebe zur Untersuchung der vorhandenen Leukozytenpopulation*

Viele bisher publizierte Daten über die zelluläre Zusammensetzung venöser Thromben leiten sich von histologischen Schnittbildern ab. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie sollen vor allem die im gesamten Thromben- und Venengewebe noch lebendenden und somit aktiven Zelltypen betrachtet werden.

4. *Charakterisierung der Auswirkung auf die Thrombenentstehung und Auflösung durch die Depletion von Monozyten/Makrophagen im Modell der LysMCre-iDTR Maus*

Monozyten/Makrophagen spielen eine wichtige Rolle im Prozess der Thrombose. Es sollen zum einen die Auswirkungen einer verminderten Anzahl an Monozyten im Entstehungsprozess, zum anderen die Konsequenz einer Depletion von Lysozym M positiven Zellen in der LysMCre-iDTR-Maus auf den Auflösungsprozess untersucht werden.

5. *Untersuchung der Auswirkung einer Verschiebung zur T_H2 Immunantwort auf den Auflösungsprozess venöser Thromben*

Gerade im Auflösungsprozess einer venösen Thrombose spielen Zytokine eine wichtige Rolle. So wurde bereits gezeigt, dass in der Interferon gamma knockout Maus eine bessere Thrombenauflösung stattfindet. Die Verschiebung des Zytokinmusters zur T_H2 Immunantwort in der Tbx 21 ko Maus soll in einer longitudinalen Studie zeigen wie sich diese Verschiebung auf den Auflösungsprozess auswirkt.

6. *Auswirkung auf die Bildung eines venösen Thrombus in der Abwesenheit von CD4-positiven Zellen*

Gerade im frühen Stadium des gebildeten Thrombus besteht der höchste Anteil an CD4-positiven Zellen. In diesem Zusammenhang soll geklärt werden, wie sich eine Depletion dieser Zellen auf die Thrombenentstehung und dessen zelluläre Zusammensetzung auswirkt.

III. Material

1. Laborgeräte und technisches Zubehör

Tabelle 2: Verwendete Laborgeräte und technisches Zubehör

Gerät	Bezeichnung und Hersteller
Durchflusszytometer	BD FACS Canto II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)
Heizblock	Thermomix Comfort (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Intraoperatives Tierbewärmungssystem	IOW-3704 (Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim, Deutschland)
Mikroskope	MSZ5000-IL-TL Stereomikroskop (Krüss Optronic GmbH, Wetzlar, Deutschland) Leica M 50 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland)
Pipetten	Eppendorf Research® plus Pipetten 10, 20, 100, 200, 1000 µL (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Real time PCR cycler	CFX96 Real-time PCR detection system mit C1000 Thermal cycler (Biorad, München, Deutschland)
Ultraschallgerät	Vevo 770 (VisualSonics, Toronto, Ontario, Kanada)
Ultraschallkopf	RMV706 (20-60 MHz; Mouse vascular, abdominal) (VisualSonics, Toronto, Ontario, Kanada)
UV-VIS Spektrophotometer	Nano Drop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)
Vortex Genie 2	Scientific Industries (Bohemia, NY, USA)
Zentrifugen	Eppendorf Zentrifuge 5810R Mikrozentrifuge Eppendorf 5417R Mini-Spin Eppendorf (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

1.1 Vorbereitung Ultraschallkopf

Tabelle 3: Utensilien Ultraschallkopf

Gerät	Bezeichnung und Hersteller
Spezielle Kanüle	Gewinkelte Kanüle (VisualSonics, Toronto, Ontario, Kanada)
Ersatzmembran	General near acustic window sealed; part # 11139 (VisualSonics, Toronto, Ontario, Kanada)

2. Chirurgische Instrumente

Tabelle 4: Verwendete chirurgische Instrumente

Instrument	Bezeichnung und Hersteller
Pinzetten	Mikro-Präparierpinzette, gerade HWC 110-10/ Mikro-Präparierpinzette, gebogen HWC 112-10/ (Hammacher GmbH, Solingen, Deutschland) Extra fine Graefe forceps, gebogen (Fine science tools, Heidelberg, Deutschland)
Scheren	Hardened fine iris scissor, gerade, 11 cm/ Surgical scissors - sharp/blunt 12 cm (Fine science tools, Heidelberg, Deutschland)
Klemme/ Nadelhalter	Halsted-mosquito hemostats - 12.5 cm, gerade/ Olsen-Hegar needle holder (Fine science tools, Heidelberg, Deutschland)
Ohrlochzange	Finger loop ear punch (Fine science tools, Heidelberg, Deutschland)

3. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5: Verwendetes Verbrauchsmaterial

Material	Bezeichnung und Hersteller
Cleanex-Tücher	Kosmetiktücher, 2-lagig, weiß Gottron Reinigungsmittel

Einbettkassetten	Rotilabo®-Einbettkassetten L 40 x B 28 x H 6,8 mm (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
FACS-Röhrchen	5 ml Rundboden Zentrifugenröhrchen (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland)
Falcon-Röhrchen	15 ml und 50 ml Falcon-Röhrchen (Greiner, Nürtingen, Deutschland)
Kanülen	30 G; 0,30 x 13 mm (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland)
Latexhandschuhe	Lohmann & Rauscher (Neuwied, Deutschland)
Leukofix (2,5cm x 9,2m)	BSN Medical (Hamburg, Deutschland)
Nahtmaterial	Ethicon® Prolene 7-0 (Johnson & Johnson, New Brunswick, NJ, USA)
PCR-Platten	Low profile 96-well unskirted PCR plate, natural (Biorad, Hercules, CA, USA) Abdeckfolie viewseal (Greiner, Nürtingen, Deutschland)
Petrischalen	94 x 16 mm (Greiner; Nürtingen; Deutschland)
Pipettenspitzen	weiße Spitzen, 10 µl gelbe Spitzen, 200 µl blaue Spitzen, 1000 µl (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Präparationsunterlagen	Molinea plus, 40 x 60 cm (Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland)
Rasierklingen	37 mm/0,12 mm (Plano, Wetzlar; Deutschland)
Reaktionsgefäße	1,5 ml Eppis, klar 2,0 ml Eppis, klar (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Spritzen	1 ml-Spritze, Tuberkulinspritze, grün 2 ml-Spritze, Injekt Luer (Braun B., Melsungen, Deutschland) 5 ml-Spritze, BD Discardit II (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland)

Wägeschalen	Wägeschälchen, antistatisch, weiß, 30 ml (VWR, Darmstadt, Deutschland)
Wattestäbchen	Swab, Holz/Watte (VWR, Darmstadt, Deutschland)
Zellkulturplatten	6-well Platten, Flachboden mit Deckel (Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland)
Zellsiebe	40 µm und 70 µm Nylon Zellsieb (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland)

4. Chemikalien, gebrauchsfertige Lösungen

Tabelle 6: Verwendete Lösungen

Reagenzien	Hersteller
Augensalbe	Bepanthen® Nasen- und Augensalbe (Bayer, Leverkusen, Deutschland)
Atipamezol-Hydrochlorid	Pfizer, New York, NY, USA
BD FACS™ Lysing solution	(BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Buprenorphin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Calciumchlorid (CaCl) Dihydrat (CaCl ₂ x 2H ₂ O)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Collagenase Typ II	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
D-Glucose 5%	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Diphtherietoxin	Merck, Darmstadt, Deutschland
DNAse-I	Roche, Mannheim, Deutschland
Enthaarungscreme	SNÄ® Epil (Rufin cosmetic GmbH, Langenhagen, Deutschland)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Dinatriumsalz Dihydrat	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Fentanyl-Dihydrogencitrat	Johnson&Johnson, New, Brunswick, NJ, USA
Flumazenil	B. Braun, Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Guanidiniumisothiocyanat	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Hank's BSS (1x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Heparin-Natrium-25000-ratiopharm®	Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Histopaque® 1077/1119	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Isofluran (Forene)	Abbott, Wiesbaden, Deutschland
Isopropanol, 70% rein	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isotonische Kochsalzlösung 0,9%	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat Trihydrat ($K_2HPO_4 \times 3H_2O$)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumsulfat-Heptahydrat ($MgSO_4 \times 7H_2O$)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Medetomidin-Hydrochlorid	Pfizer, Berlin, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Midazolam-Hydrochlorid	Pharma Plus GmbH, Hameln, Deutschland
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2- ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Naloxon-Hydrochlorid	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Natriumazid (NaN_3)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natrium-Acetat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natrium-Citrat Dihydrat pH 7,0	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
N-Laurylsarkosin Natriumsalz	Merck, Darmstadt, Deutschland
Roti®-Aqua-Phenol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Chlorophorm- Isomylalkohol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

β-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
-------------------	-----------------------------------

5. Reagenzien zur RNA-Analyse

Tabelle 7: RNA-Analyse Kit

Kit	Hersteller
QuantiTect probe RT-PCR kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

6. Durchflusszytometrie

Tabelle 8: Verwendete FACS-Antikörper und Fluorochrome

Antikörper (anti-mouse):	gekoppeltes Fluorochrom:	Klon:	Firma:
CD45	APC-eFluor 780	30-F11	eBioscience (San Diego, CA, USA)
CD11b (Mac-1)	PE	M1/70	BD Pharmingen TM (Heidelberg, Deutschland)
CD16/CD32 (FC receptor block)	-	93	eBioscience (San Diego, CA, USA)
F4/80	APC	BM8	eBioscience (San Diego, CA, USA)
Ly6C	Per-Cp5.5	AL-21	BD Pharmingen TM (Heidelberg, Deutschland)
Ly6G und Ly6C (Gr1)	FITC	RB6-8C5	BD Pharmingen TM (Heidelberg, Deutschland)
TCR beta	PE-Cy5	H57-597	eBioscience (San Diego, CA, USA)
CD4 (L3T4, Ly-4)	FITC	GK1.5	eBioscience (San Diego, CA, USA)
CD8a	APC	53-6.7	eBioscience (San Diego, CA, USA)
Nk1.1	PE-Cy7	PK136	eBioscience (San Diego, CA, USA)
Name:	gekoppeltes Fluorochrom:	Klon:	Firma:
Viability dye	AmCyan	-	eBioscience (San Diego, CA, USA)
Annexin V	FITC	-	BD Pharmingen TM (Heidelberg, Deutschland)
7-AAD (7-amino actinomycin D)	PerCP-Cy5.5	-	BD Pharmingen TM (Heidelberg, Deutschland)

7. Primer

Tabelle 9: Verwendete Primer

Zielgen	Spezies	Nummer	Hersteller
Beta-Aktin	Maus	Mm00607939_s1	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
CCL 2	Maus	Mm00441242_m1	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
F3 (TF)	Maus	Mm00438853_m1	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
IL4	Maus	Mm00445259_m1	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
IL10	Maus	Mm00439614_m1	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
IL12p40	Maus	Mm00434174_m1	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
IL33	Maus	Mm00505403_m1	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
iNOS	Maus	Mm00440485_m1	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
TBP	Maus	Mm00446973_m1	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
TGF beta	Maus	Mm01298616_m1	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
VCAM	Maus	Mm00449197_m1	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
VEGF	Maus	Mm01281449_m1	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

8. Puffer

Tabelle 10: Verwendete Puffer

Puffer	Zusammensetzung/ Hersteller
1x PBS	Life Technologies, N.Y., USA
10x Annexin V binding puffer	BD Pharmingen™, (Heidelberg, Deutschland)
FACS I-Puffer	DPBS 400 ml 5 % BSA 100 ml (1 %) 20 % NaN ₃ 2,5 ml (0,1 %)
FACS II-Puffer	DPBS 400 ml 5 % BSA 100 ml (1 %) 20 % NaN ₃ 2,5 ml (0,1 %) 0,5 M EDTA 20 ml (20 mM)

Krebs-Hepes-Puffer (pH 7,35)	99,01 mM NaCl 4,69 mM KCl 2,5 mM CaCl ₂ 1,2 mM MgSO ₄ 25 mM NaHCO ₃ 1,03 mM K ₂ HPO ₄ 20 mM Hepes 11,1 mM D-Glucose
Git-Puffer	4 M Guanidiniumisothiocyanat 25 mM Na-Citrat pH 7,0 0,5 % N-Laurylsarcosin

9. Spezielle Software

Tabelle 11: Verwendete Software

Software	Hersteller
BD FACS DIVA Software	Becton Dickinson; Mountain View, CA, USA
EndnoteX6	Thomson Reuters (NY, USA)
Graph Pad Prism	Graphpad Software Inc., La Jolla, CA, USA
Microsoft Office (Word, Excel)	Redmond, Washington, USA
Power Doppler Mode; Pulsed-Wave Doppler Mode; B-Mode	VisualSonics, Toronto, Ontario, Kanada

IV. Methoden

1. Versuchstiere

Auf Grund vieler etablierter Thrombosemodelle und einer weitreichenden Publikationsliste wird im Bereich der Thromboseforschung häufig auf die Maus als Versuchstier zurückgegriffen^{1, 3, 17, 24, 25, 35, 58}. Der komplexe Vorgang der Thrombenbildung sowie der Thrombenauflösung lässt sich *in vitro* nur eingeschränkt verfolgen. Des Weiteren ist die Möglichkeit der Nutzung transgener Mauslinien ein wichtiger Aspekt, Versuche im Mausmodell durchzuführen.

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Mausstämme verwendet:

- C57BL/6J
- Tbx 21 ko
- LysMCre
- LysMCre-iDTR

Alle aufgeführten Mausstämme sind genetisch auf einem C57BL/6J Hintergrund gezüchtet.

1.1 Rechtliche Voraussetzungen

Die tierexperimentellen Versuche wurden durch das Landesuntersuchungsamt Mainz genehmigt (Aktenzeichen 23 177-07-04/G11-1-018; 23 177-07/G 12-1-002) und von dem Ethikkomitee der Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz zugelassen.

1.2 Haltung und Zucht der Versuchstiere

Die Tiere wurden in der Zentralen Versuchstiereinrichtung der Universitätsmedizin Mainz in einer spezifiziert pathogenfreien Umgebung gehalten. Durch regelmäßige Kontrolle nach FELASA Empfehlung (Federation of European Laboratory Animal Science Association) wurde dort das Vorkommen von pathogenen Keimen überwacht. Durch die Verwendung von Filtertop Makrolonkäfigen Typ II wurden pro Käfig maximal fünf Tiere, getrennt nach Geschlecht, in der Haltung und maximal drei Tiere pro Käfig in der Zucht eingesetzt. Bei den Zuchten handelte es sich jeweils um Inzuchtstämme. Als Einstreu wurde entkeimtes, entstaubtes Weichholzgranulat

verwendet, welches einmal pro Woche gewechselt wurde. Um den Spiel- und Nestbautrieb der Tiere zu stillen, wurden sterilisierte Zellstofftücher und Plastikröhren verwendet. Entsprechend der Empfehlung der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS) wurde das „Mikroklima“ bei einer Temperatur von 20 bis 24°C und einer Luftfeuchtigkeit von 45 bis 65% konstant gehalten⁴⁹. Mittels Beleuchtungsanlage wurde für die nachtaktiven, stressanfälligen Tiere ein geregelter zwölfstündiger Hell-Dunkel-Rhythmus sichergestellt, wobei in der Hell-Phase 50–100 Lux an Leuchtstärke im Käfig erreicht wurde. Allen Tieren stand Leitungswasser und pelletiertes, artgerechtes Futter (Firma: ssniff Spezialdiäten GmbH) *ad libitum* zur Verfügung.

1.3 Kontrollstämme

1.3.1 C57BL/6J Mäuse

Als Kontrollstamm wurde die C57BL/6J Maus verwendet, da alle weiteren transgenen bzw. knockout Stämme diesen Kontrollstamm als genetischen Hintergrund besitzen. Hierbei handelt es sich um einen Inzuchtstamm, der zu den am häufigsten verwendeten Mauslinien gehört und dessen Genom bereits komplett sequenziert wurde¹⁰⁷.

1.4 Transgene Stämme

1.4.1 Tbx 21 ko Mäuse

Bei dieser Mauslinie handelt es sich um einen homozygoten knockout (-/-) im Bereich des Tbx 21 Genes. Tbet, kodiert durch das Tbx 21 Gen, ist spezifisch für Immunzellen und gehört zur T-box Familie an Transkriptionsfaktoren⁷⁸. Dieser Mausstamm zeichnet sich durch eine reduzierte Interferon gamma Produktion aus, vor allem induziert durch CD4-positive T-Zellen und Natürliche Killerzellen¹⁴⁵. Es kommt zu einer Verschiebung der T_H1 zur T_H2 Immunität⁷⁷. Die Tbx 21 ko Mäuse auf C57BL/6 Hintergrund waren ein Geschenk von Frau Prof. Laurie Glimcher, Harvard Medical School, Cambridge, USA.

Resultat A:

Die Verwendung der Tbx 21 ko Maus ermöglichte die Untersuchung einer reduzierten Interferon gamma Produktion durch T_H1-Zellen, was zu einer vermehrten Produktion von T_H2 spezifischen Zytokinen führte.

1.4.2 LysMCre Mäuse

Beim knockin Mausstamm LysMCre wurde das Gen für die Cre-Rekombinase stromabwärts vom Promoter des Lysozym M (LysM) Locus auf dem murinen Chromosom 10 eingebracht, wodurch eine Cre-Expression spezifisch in Lysozym M positiven Zellen (vor allem Makrophagen und Granulozyten) erreicht wurde¹⁶. Dieser Stamm diente als Kontrollstamm für die unter 1.4.3 aufgeführte und in dieser Arbeit verwendete LysMCre-iDTR Maus. LysMCre Mäuse auf C57BL/6 Hintergrund waren ein Geschenk von Frau Prof. Irmgard Förster und wurden vom Paul-Ehrlich-Institut (Langen, Deutschland) bezogen.

1.4.3 iDTR (LysMCre-iDTR) Mäuse

Bei der iDTR Maus erfolgte zunächst ein knockin des Rezeptors für Diphtherietoxin (DTR) in die Rosa26 Genpromotor-Region des murinen Chromosoms 6. Die Rosa26 Genfunktion wurde dabei zerstört. Die DTR-Expression erfolgte in allen Geweben, da der Promotor des Rosa26 Gens ubiquitär vorliegt. Zwischen Promotor und DTR-Leserahmen wurde zusätzlich ein von loxP Erkennungsstellen flankiertes Stopp-Signal eingebracht. Die LysMCre-iDTR Mäuse auf C57BL/6 Hintergrund waren ein Geschenk von Prof. Ari Waisman, Molekulare Medizin der Universitätsmedizin Mainz.

1.5 Depletion der myelomonozytären Zellen unter Verwendung von Diphtherietoxin in LysMCre-iDTR Mäusen

Durch Kreuzung von LysMCre mit iDTR Mäusen wurde durch Ausnutzung des Cre/loxP-Systems⁷⁰ das Stopp-Signal auf LysM positiven Zellen spezifisch deletiert (s. Abb. 5), so dass in den generierten LysMCre-iDTR Tieren der DTR ausschließlich auf Lysozym M positiven Zellen (Monozyten, Granulozyten) exprimiert wurde. Dies ermöglichte die Depletion Lysozym M-positiver Zellen durch die Verabreichung von Diphtherietoxin (DTX), während alle anderen Zelltypen unbeeinflusst blieben. Eine intraperitoneale (i.p.) Injektion von Diphtherietoxin (DTX) führt demnach zum Absterben LysM exprimierender Zellen⁴⁷. Da sich Lebensdauer und Erneuerungsrate bei Granulozyten und Monozyten unterscheiden⁴⁷, wurden in der vorliegenden Arbeit durch das verwendete Injektionsschema von DTX (Abb. 7) weitgehend nur die Population der monozytären Zellen beeinflusst. Abbildung 6 zeigt den Depletionsverlauf über einen Zeitraum von 12 Tagen anhand von durchflusszytometrisch untersuchten Blutproben. Dieses transgene Mausmodell wurde bereits in Wund-

heilungsstudien sowie in Studien zur vaskulären Dysfunktion verwendet und stellt somit eine etablierte Methode dar^{47, 159}.

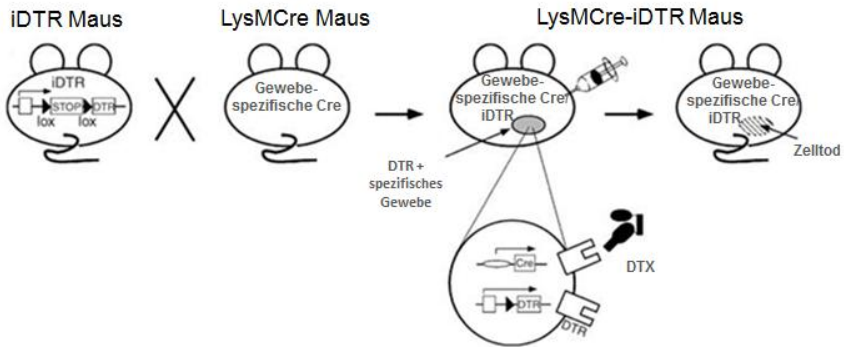


Abbildung 5: Schematische Darstellung des iDTR Systems in der Maus (modifiziert nach¹³).

Die STOP-Kassette zwischen den beiden loxP-Stellen (von engl. „locus of X-over P1“), welche die Expression des Diphtherietoxin-Rezeptors (DTR) verhindert, wird durch das Einkreuzen einer gewebespezifischen Cre-Maus (Cre-Rekombinase, von engl. „causes recombination“) entfernt. Dadurch kann der DTR in spezifischen Geweben exprimiert werden und die Injektion von Diphtherietoxin (DTX) führt nach dessen Bindung an den DTR zum Absterben der gewebsspezifischen Zellen.

In dieser Arbeit erfolgte die Verwendung zweier verschiedener Versuchsregime (Abb. 7), da die Gabe von DTX über einen längeren Zeitraum zu einem verschlechterten Allgemeinzustand der Tiere führt. Die Venenligatur in der Auflösungsstudie fand zu einem früheren Zeitpunkt statt (Abb. 7 B_1 und B_2) als in der Entstehungsstudie (Abb. 7 A). Generell wurde jedoch die DTX-Dosierung von 25 ng/g KG an Tag 1-3 verwendet und an Tag 4-10 eine Dosierung von 5 ng/g KG. Das Diphtherietoxin mit einer Ausgangskonzentration von 1 µg/µl wurde mit PBS auf eine Konzentration von 5 ng/µl verdünnt. Von dieser Ausgangslösung wurden den LysMCre-iDTR Mäusen und den LysMCre-Kontrolltieren an Tag 1-3 täglich i.p. 5 µl/g KG appliziert. Für die Applikation an Tag 4-10 wurde die Diphtherietoxinlösung nochmal 1:5 verdünnt, um eine Endkonzentration von 1 ng/µl zu erhalten. Das genaue Körpergewicht der Mäuse wurde jeweils vor der Applikation bestimmt. Abbildung 7 A zeigt das Protokoll für eine lange Depletion der LysM-positiven Zellen in der LysMCre-iDTR-Maus.

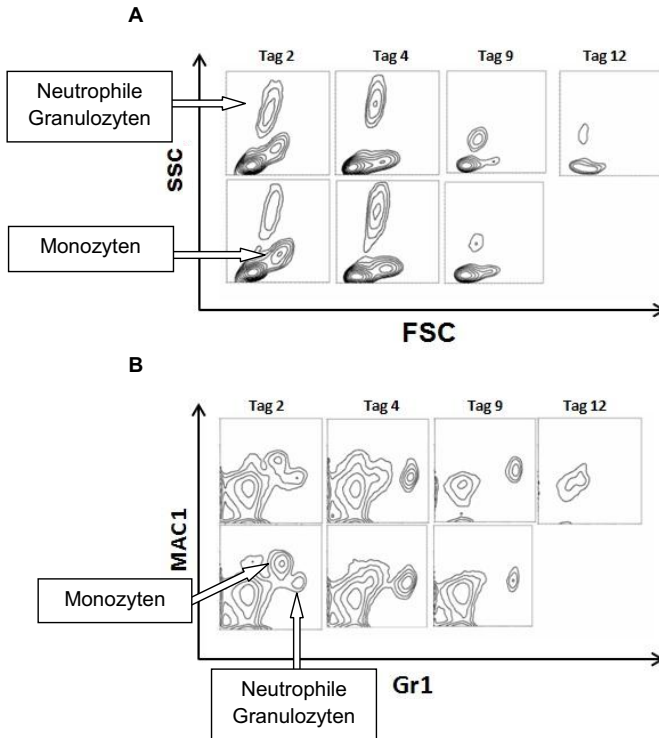


Abbildung 6: Depletion von myelomonozytären Zellen im Verlauf der Behandlung mit DTX.

Durchflusszytometrische Analyse von Blutproben der mit DTX behandelten LysMCre-iDTR Maus (ohne Venenligatur). Abbildung A zeigt eine Abnahme an monozytären Zellen im SSC/ FSC (engl. „sidward scatter/ forward scatter“). Die Immunfluoreszenzmarkierungen der Oberflächenantigene Gr1 (Granulozyten-Differenzierungsantigen 1) und Mac1 (Makrophagen-Antigen 1) ermöglichen es, eine Verringerung der Zellpopulation von Monozyten im Blut über einen Zeitraum von 12 Tagen darzustellen (modifiziert nach¹³).

Die Ligation der *Vena cava caudalis* wurde am 9. Depletionstag durchgeführt und die Tiere 48 Stunden später für die Gewebeentnahme getötet. Im Unterschied dazu fand, wie in Abbildung 7 B gezeigt, die Venenligatur der restlichen Versuche bereits an Tag drei der DTX-Gabe statt.

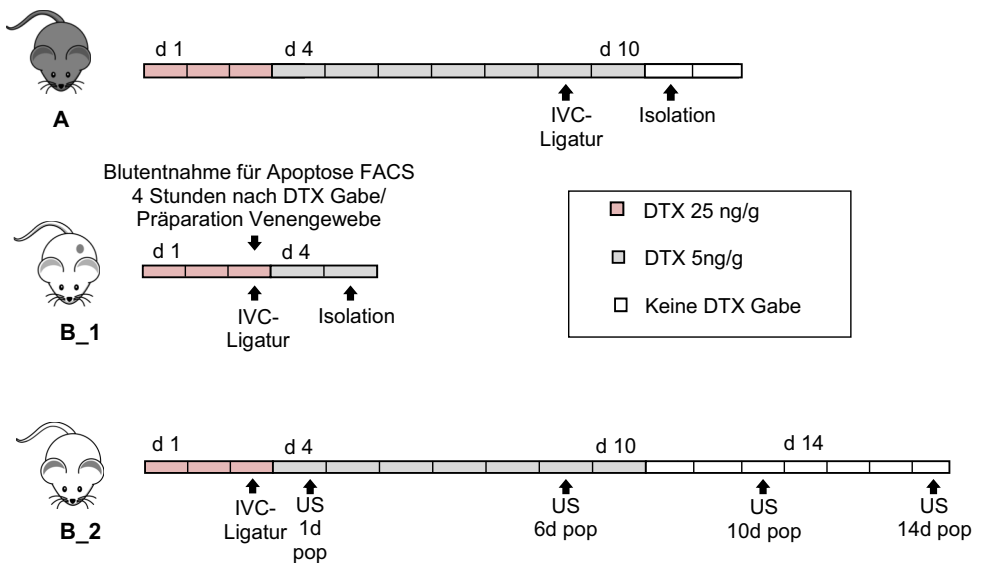


Abbildung 7: Schematische Übersicht der Versuchsabläufe im Modell der LysMCre-iDTR Maus.

Der Unterschied zwischen Versuchsschema **A** und **B** liegt im Zeitpunkt der durchgeführten Venenligatur (s. Kap. 3.1). Diese erfolgte im Schema **B** zu einem wesentlich früheren Zeitpunkt der Diphterietoxingabe. Allgemein gibt dieses Schema eine Übersicht über den Zeitpunkt der *Vena cava* (IVC) Ligatur, den Isolationszeitpunkt (kurz als Isolation bezeichnet), sowie die Zeitpunkte der durchgeführten Ultraschalluntersuchungen (US d pop; Ultraschall an Tag x postoperativ). Schema **A** verfolgte die Untersuchungsweis eines venösen Thrombus in der *Vena cava caudalis*, im Gegensatz dazu diente Schema **B** vorwiegend der Untersuchung des Auflösungsprozesses eines venösen Thrombus im Mausmodell der LysMCre-iDTR Maus.

Resultat B:

Die Verwendung der LysMCre-iDTR Maus ermöglicht es, den Einfluss monozytärer Zellen im Entstehungs- und Auflösungsprozess einer venösen Thrombose im Mausmodell zu klären.

1.6 *In vivo* Depletion von CD4 positiven T-Zellen

Ein Einfluss von Lymphozyten im Entstehungsprozess einer venösen Thrombose ist bisher nicht nachgewiesen⁶¹. Dennoch zeigten Hish et al. (2014) dass Lymphozyten

in der Venenwand, nach Induktion einer venösen Thrombose, Bestandteil der infiltrierenden Zellen waren⁵⁹. Die verschiedenen Differenzierungsmöglichkeiten einer naiven CD4 positiven Zelle (Abb. 4) könnten somit den Prozess der Thrombusentstehung beeinflussen. Eine allgemeine Depletion CD4 positiver Zellen wäre eine Möglichkeit erste Erkenntnisse zu gewinnen. Mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen den CD4-Rezeptor^{106, 124}, welcher einer Antikörperproduzierenden Hybridomazelllinie entstammte (der antikörperhaltige Überstand wurde von der AG Becker der Hautklinik, Universitätsmedizin Mainz, zur Verfügung gestellt) wurden 10-12 Wochen alte männliche C57BL/6 Mäuse behandelt. Den Tieren wurden jeweils im Verhältnis 1:1 (was einem Volumen von 500 µl entsprach), i.p. und s.c. 135 µg des depletierenden Antikörpers mit der Bezeichnung GK1.5 verabreicht. Zur Aufrechterhaltung der Depletion wurde der Antikörper zudem an Tag eins, zwei und drei i.p. und s.c., sowie an Tag vier nur i.p. verabreicht. Eine Kontrolle des Depletionserfolges wurde durchflusszytometrisch für CD4 positive Zellen in den verwendeten Geweben (Thrombenmaterial und Venenwand) durchgeführt.

Resultat C:

Die Verwendung eines Antikörpers zur Depletion CD4-positiver Zellen ermöglicht die Untersuchung des Einflusses dieser Zellpopulation im Entstehungsprozess einer venösen Thrombose im Mausmodell.

Resultate A+B+C:

Zusammenfassend sollten in dieser Arbeit die Depletion Lysozym M positiver- sowie CD4 positiver Zellen und die Verschiebung der Zytokinmuster zur T_H2-Immunantwort im Entstehungs- und Auflösungsprozess venöser Thromben im Stenose Modell der *Vena cava caudalis* untersucht werden. Hierzu wurden die in A, B, und C dargestellten Mauslinien und Methoden verwendet.

2. Wahl und Durchführung der Narkose

Für die Durchführung von operativen Eingriffen ist eine Allgemeinanästhesie mit dem Erreichen des Toleranzstadiums essentiell. Sie wird definiert als ein durch Anästhetika bedingter Zustand der Bewusstlosigkeit (Hypnose), der Bewegungslosigkeit (Immobilisation, Relaxation) und der reduzierten Schmerzempfindung (Analgesie)³³. Die Auswahl der Anästhetika erfolgt im Bereich der Versuchstierkunde

nach verschiedenen Kriterien. Vor allem müssen die Art des Eingriffes sowie deren Dauer und die allgemeine Schmerzhaftigkeit bedacht werden. Zum anderen ist die Erfahrung des Operateurs zu berücksichtigen und eventuelle Wechselwirkungen mit anderen verabreichten Testsubstanzen oder inwiefern auf andere Art und Weise ein Einfluss auf zu erwartende Ergebnisse besteht.

2.1 Anästhesie für den operativen Eingriff (*Vena cava* Ligatur)

Für die Durchführung der *Vena cava* Ligatur wurde eine Injektionsnarkose bestehend aus drei verschiedenen Komponenten verwendet. Zur Herbeiführung einer potenten Analgesie wurde der Opiatagonist Fentanyl verwendet und ergänzte hiermit die Wirkung des sedativ-hypnotischen Analgetikums Medetomidin. Als α 2-Adrenorezeptoragonist führt Medetomidin zu einer guten Sedierung sowie Muskelrelaxation bei geringen Nebenwirkungen auf Herzfrequenz und Blutdruck, sowie Atemdepression. Um die Sedierung und Muskelrelaxation weiter zu verstärken, wurde zusätzlich das Benzodiazepin Midazolam verwendet.

Die Mischung aus 5,0 mg/kg KG Midazolam, 0,5 mg/kg KG Medetomidin und 0,05 mg/kg KG Fentanyl wurde vor Operationsbeginn durch i.p. Applikation verabreicht (Tab. 12). Das gesamte Injektionsvolumen lag bei 250 μ l. Um eine Hypothermie während des Eingriffes zu vermeiden, wurde das Versuchstier auf einem intraoperativen Tierbewärmungssystem fixiert und die Körperkerntemperatur mittels Rektalsonde überwacht. Vor Beginn der Laparotomie wurde die Narkosetiefe durch den Zwischenzehenreflex überprüft. Dieser sollte im Toleranzstadium nicht mehr vorhanden sein. Da während der Narkose auch der Lidreflex ausgeschaltet ist, wurde ein Austrocknen der Kornea durch das Aufbringen einer pflegenden Augensalbe verhindert.

Der Eingriff zur Induktion einer venösen Thrombose umfasste einen Zeitraum von maximal 20 Minuten. Die Allgemeinanästhesie wurde durch die subkutane (s.c.) Gabe eines Gemisches aus Naloxon (Opiatantagonist), Atipamezol (α 2-Adrenorezeptorantagonist) und Flumazenil (Benzodiazepinantagonist) vollständig antagonisiert (Tab.12). Bei den Wirkstoffen zur Antagonisierung der Anästhetika handelt es sich um kompetitive Antagonisten, die den Wirkstoff von seinem Rezeptor verdrängen, um die eigentliche Wirkung wieder rückgängig zu machen.

Tabelle 12: Dosierung der Anästhetika und der dazu benötigten Antagonisten

Anästhetika	Medetomidin	Midazolam	Fentanyl
Dosierung	0,5 mg/kg i.p.	5 mg/kg i.p.	0,05 mg/kg i.p.
	↓	↓	↓
Antagonisten	Atipamezol	Flumazenil	Naloxon
Dosierung	2,5 mg/kg s.c.	0,5 mg/kg s.c.	1,2 mg/kg s.c.

2.2 Anästhesie für sonographische Untersuchungen

Da es sich bei der sonographischen Untersuchung um eine nicht invasive Methode handelt, kann die für die Allgemeinanästhesie notwendige Komponente der Analgesie vernachlässigt werden. Für die Untersuchung wurde deswegen eine Inhalationsnarkose mit Isofluran verwendet. Isofluran, ein Inhalationsanästhetikum mit nur geringer analgetischer Wirksamkeit, wurde als 2-4 % Gemisch mit 100 % Sauerstoff in eine Kammer geleitet, um die Narkose der Tiere zu induzieren. Eine Aufrechterhaltung der Narkose wurde durch eine Gesichtsmaske erreicht; hierbei war eine Konzentration von 1-2 % Isofluran bei einem Fluss von 0,4-0,6 l/min an 100 % Sauerstoff ausreichend. Während der Narkose wurden die Tiere auf einem geeigneten Tierbewärmungssystem gelagert und die Körperkerntemperatur mittels Rektalsonde überwacht. Im Rahmen der Blutentnahme durch Herzpunktion (Finalversuch) wurde ebenfalls die Inhalationsanästhesie mit Isofluran angewendet.

3. Mausmodell der venösen Thrombose

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, gibt es mehrere Möglichkeiten, eine venöse Thrombose im Mausmodell experimentell zu induzieren^{25, 87}. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Stenose Modell der unteren Hohlvene (*Vena cava inferior*, beim Tier *Vena cava caudalis*), eingesetzt. Dieses Gefäß verläuft im Abdominalbereich in direkter Nachbarschaft zur Hauptschlagader (*Aorta abdominalis*) entlang der Wirbelsäule. Bei dem angewandten Stenose Modell wurde unterhalb der linken Nierenvene unter Verwendung einer Ligatur und Einbringen eines Platzhalters eine Flussverlangsamung der *Vena cava caudalis* bewirkt. Es wurden für die Versuche nur männliche Tiere in einem Alter zwischen 10-12 Wochen verwendet.

Nach Narkotisierung und Überprüfung des Narkosestadiums (s. Kap. 2.1) wurde die Bauchregion des Versuchstieres enthaart und desinfiziert. Die Maus wurde hierzu auf einem Tierbewärmungssystem fixiert und die Körperkerntemperatur mittels Rektalsonde überwacht. Im Bereich der Nabelregion erfolgte ein ca. zwei cm langer medianer Hautschnitt. Es wurden Anteile der äußeren Bauchmuskulatur (*M. obliquus externus abdominis*) und der *Linea alba* sichtbar. Die Eröffnung der Bauchhöhle erfolgte durch einen vorsichtigen Schnitt entlang der *Linea alba* unter leichtem Anheben der Muskulatur, um eine Verletzung des Darmes zu verhindern. Das Darmkonvolut wurde unter Verwendung eines Wattestäbchens vorsichtig auf die linke Seite außerhalb des Bauchraumes auf eine sterile Mullkomresse verlagert, welche zuvor mit körperwarmer NaCl-Lösung benetzt wurde. Um ein Austrocknen des Darmes zu verhindern, wurde dieser nochmals mit körperwarmer Lösung benetzt und durch die befeuchtete Mullkomresse vollständig abgedeckt. Das Einbringen eines Haltefadens in den Bereich der rechten Bauchmuskulatur erleichterte den Blick auf die *Vena cava caudalis*. Unterhalb der linken Nierenvene wurde die *Vena cava* mit Hilfe einer stumpfen Präparationstechnik untertunnelt und unter Verwendung eines 7-0 Prolene Fadens eine Ligatur vorbereitet. Vor dem Verschließen der Ligatur wurde ein Draht als Platzhalter auf der Vene positioniert und die Ligatur einfach verschlossen. Anschließend wurde der Draht wieder entfernt. Darauf erfolgte die Rückverlagerung des Darmkonvolutes und der Verschluss der Bauchmuskulatur durch eine fortlaufende Naht mit 7-0 Prolene Faden. Die Haut wurde mit Einzelheften wieder verschlossen und die Maus erhielt nach Beendigung der OP-Prozedur das Antidot der Narkose. Die Gabe von 0,1 mg/kg KG Buprenorphin zu Beginn der Operation gewährleistete die postoperative Schmerzabdeckung. Bei Tieren, die einer Schein-Operation unterzogen wurden, erfolgte nur ein Untertunneln des Gefäßes mit anschließendem Einbringen eines Fadens, welcher sofort wieder entfernt wurde.

4. Haltungsbedingungen der Tiere im Experiment

Nach durchgeführter Operation wurden die Tiere für mindestens eine Stunde unter kontrollierten Wärmebedingungen beobachtet um eine optimale Aufwachphase zu gewährleisten. Der Käfig wurde dazu im kontrollierten Abstand vor einer Wärmelampe platziert, um eine Hypothermie in der Aufwachphase zu vermeiden. Danach wurden die Tiere für mindestens 12 Stunden in einen ventilierten Haltungsschrank (Ventilated Cabinet; Tecniplast) verbracht und nach Ablauf der

analgetischen Wirkungszeit (Wirkdauer von Buprenorphin ca. 8-12 Stunden) erneut beurteilt und gegeben falls behandelt. Vierundzwanzig Stunden nach erfolgter Operation wurden die Tiere in den konventionellen Haltungsbereich des Institutes eingestallt. Im Verlauf des Beobachtungszeitraumes wurde täglich einmal der Allgemeinzustand der Tiere erfasst. Eine Beurteilung von Verhalten, Aussehen und Atmung sowie die Beurteilung der Bauchnaht wurden durch das wissenschaftliche Personal im Institut sichergestellt.

5. Sonographische Untersuchung

Die als Ultraschalluntersuchung oder auch als Sonografie bzw. Echografie bezeichnete Methode zählt zu den nicht invasiven bildgebenden Verfahren, welche in der Humanmedizin und der Veterinärmedizin Verwendung finden. Bei der Ultraschalluntersuchung werden Schallfrequenzen verwendet, die weit oberhalb der menschlichen Hörgrenze ($\geq 20\text{kHz}$) liegen.

Die sonographische Untersuchung von Versuchstieren stellt eine nicht invasive Methode dar, welche es ermöglicht, die Entstehung und Progression eines thrombotischen Prozesses zeitnah zu verfolgen. Die Problematik der bisher veröffentlichten Studien basiert auf der Tatsache, dass fortlaufende Prozesse nicht am gleichen Tier dargestellt wurden. Erst Aghourian et al. (2011) beschrieben die Möglichkeit der Nutzung eines Hochfrequenzultraschallsystemes zur Untersuchung von thrombotischen Prozessen in der *Vena cava caudalis* der Maus¹.

5.1 Apparativer Aufbau zur Ultraschalluntersuchung

Das Vevo 770 System bietet mit einer axialen (in Richtung der Schallausbreitung) Auflösung von $30\text{ }\mu\text{m}$ und einer lateralen (quer zur Ausbreitungsrichtung) Auflösung von $75\text{ }\mu\text{m}$ ein hoch auflösendes System zur Untersuchung kleiner Labornager. Die verwendeten Schallfrequenzen liegen um die 40 MHz , je nach eingesetztem Schallkopf. Im Vergleich dazu werden in der Humanmedizin Frequenzen von zwei bis acht MHz angewandt. Allgemein gilt: je geringer die Frequenz, desto tiefer dringt der Schall ins Gewebe ein⁵².

Bildgebende Station/ Anästhesieeinheit für Isofluran

- für Arbeitsflächen vorgesehenes Fahrbahnsystem für Ultraschallkopfhalterung
- ein justierbarer Halter für den Ultraschallkopf (Abb. 9)
- Schallkopf RMV 706 (Abb. 8)
 - Bildgebungsrate: 100 Bilder/ Sekunde
 - Frequenz 40 MHz
 - Axiale Auflösung 40 μm / seitliche Auflösung 100 μm
 - Brennweite 6 mm
 - Fokustiefe 2,2 mm
 - Sichtfeld max. 14,6 mm
- justierbare Halterung und Schienensystem für den Untersuchungstisch (Abb. 9)
- beheizbarer Untersuchungstisch (Abb. 9)
- Überwachungseinheit für Herzfrequenz durch integrierte EKG-Elektroden im beheizbaren Untersuchungstisch (in Abb. 9 erkennt man die vier goldfarbenen eingelassenen Elektroden auf der grünen Bewärmungsplattform) / Überwachung der Körperkerntemperatur durch Rektumsonde
- Isofluranverdampfer (Abb. 9) mit Sauerstoffregler

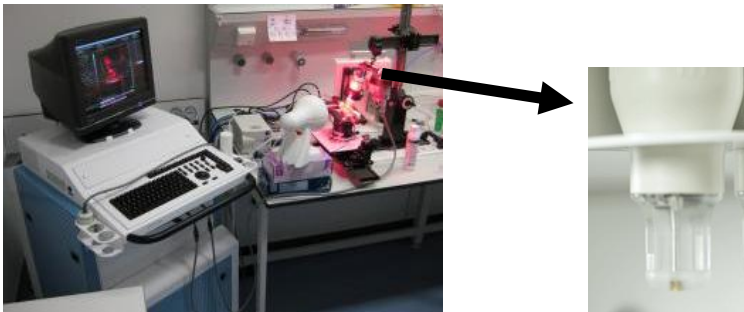


Abbildung 8: Vevo 770 Imaging System und verwendeter Schallkopf.

Allgemeine Ansicht des Vevo Imaging Systems (links) und vergrößert dargestellt (rechts) der im Versuch verwendete Ultraschallkopf RMV 706. Verhältnis Ultraschallkopf/ Körpergröße Maus entspricht etwa dem Verhältnis 1:4.



Abbildung 9: Bildgebende Station/ Anästhesieeinheit.

Detaillierte Ansicht der Bildgebenden Station. Zu sehen sind (linkes Bild) Lagerungstisch, Schienensystem, Ultraschallkopfhaltung und Überwachungseinheit. Das rechte Bild zeigt die verwendete Anästhesieeinheit. Die Aufrechterhaltung der Narkose beim Tier wurde über eine Nasenmaske gewährleistet, das überflüssige Narkosegasgemisch wurde direkt der Abluft im Raum zugeführt.

5.2 Verwendete Darstellungsmethoden der Ultraschallsignale

Die für die Ultraschalluntersuchung notwendigen Schallwellen werden durch im Ultraschallkopf vorhandene Kristalle erzeugt (piezoelektrischer Effekt). Sie dringen in das Gewebe ein und werden je nach Widerstand (Impedanz) der vorhandenen

Organe verschieden stark reflektiert (Echogenität). Damit der Übergang der Schallwellen von Ultraschallkopf in das Gewebe gewährleistet wird, ist die Verwendung eines wasserhaltigen Gels von Nutzen, um die Lufteinschlüsse zwischen Haut und Ultraschallkopf möglichst gering zu halten.

5.2.1 B-Mode Darstellung

Der B-Mode (englisch: brightness modulation) stellt ein zweidimensionales Schnittbild der zu untersuchenden Gewebestruktur dar. Die reflektierte Echointensität des Gewebes wird hierbei in verschiedenen Graustufen dargestellt. Der Grauwert eines Bildpunktes ist abhängig von der Amplitude des Echos. Das 2-D Schnittbild setzt sich aus vielen einzeln gewonnenen Linien zusammen; für jede Linie muss eine Schallwelle ausgesendet und empfangen werden.

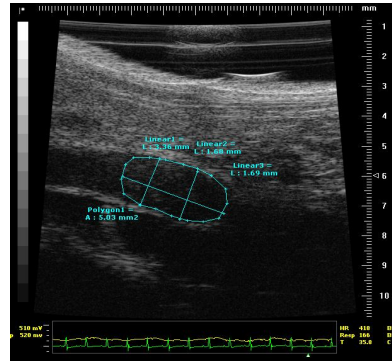
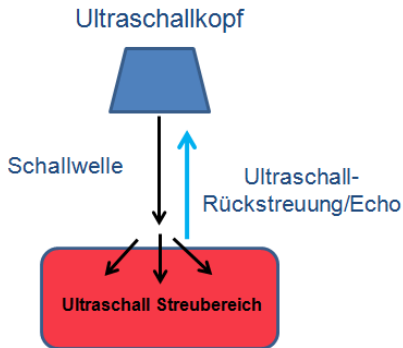


Abbildung 10: Prinzip der B-Mode Darstellung.

Schematische Darstellung der B-Mode Funktion (links) und die Umsetzung im Ultraschallbild (rechts). Die rechte Abbildung zeigt einen in der *Vena cava caudalis* ausgemessenen Thrombus.

Die Verwendung dieser Darstellungsmethode ermöglicht eine Visualisierung und (semi)quantitative Analyse anatomischer Strukturen, die zielgerichtete Injektion beispielsweise von Medikamenten oder die Punktion von Geweben oder flüssigkeitsgefüllten Hohlräumen^{122, 123}.

5.2.2 Duplex-Sonographie der Blutgefäße

Die Duplex-Sonographie (englisch: Pulsed wave Doppler) ist ein sonographisch bildgebendes Verfahren, das hauptsächlich zur Darstellung des Blutflusses in Arterien und Venen zum Einsatz kommt. Hierbei wird eine Verschiebung der Frequenz detektiert, welche durch das reflektierte Echo des eingestrahlten Ultraschalls an sich im Gefäß bewegenden Erythrozyten entsteht. Dabei kommt es zu einer Frequenzverschiebung. Bei Bewegung der Blutsäule in Richtung Schallkopf ergibt sich eine Zunahme der Schallfrequenz, bei Bewegung der Erythrozyten vom Schallkopf weg eine Abnahme. Mit Hilfe der Duplex-Sonographie können somit die Flussgeschwindigkeit und die Richtung des zu untersuchenden Blutflusses in einem Gefäß dargestellt werden. Letztlich misst man dabei immer die Änderung der Entfernung der im Messvolumen vorhandenen Streupartikel vom Schallkopf pro Zeiteinheit³⁶.

Bei der vergleichenden Darstellung beispielsweise der *Vena cava caudalis* und der *Aorta abdominalis* ergeben sich somit ein negatives Signal der Flussdarstellung für die Vene und ein positives Signal für die Aorta (Abb. 11, rechts).

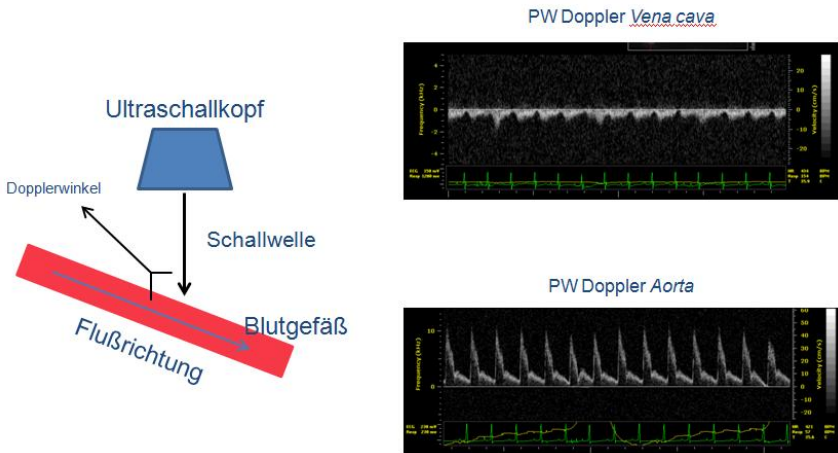


Abbildung 11: Prinzip der Dopplerfunktion.

Schematische Darstellung der Dopplerfunktion (links), sowie Beispiele für die bildgebende Darstellung der Flussverhältnisse in der *Vena cava caudalis* (rechts oben) sowie der *Aorta abdominalis* (rechts unten). Die gepulste dopplersonographische Flussmessung zeigt in der Vene eine Blutströmung unterhalb der Null-Linie (ist vom Schallkopf weg gerichtet) und in der Aorta eine Blutströmung oberhalb der Null-Linie (ist auf den Schallkopf zu gerichtet).

5.2.3 Farbkodierte Doppler-Sonographie

Mit Hilfe der farbkodierten Doppler-Sonographie (power Doppler Darstellung) können vor allem langsame Flussraten farblich dargestellt werden. Das Prinzip gleicht dem Dopplerverfahren, gibt aber keinerlei Aufschluss über Geschwindigkeit und Richtung des Blutflusses. Es wird dabei die Energie der Blutbewegung dargestellt. Dabei bietet diese Darstellung die Möglichkeit, eine semi-quantitative Erfassung der Bewegungsenergie sowie eine räumliche Verteilung der Durchblutung eines Gewebes im B-Mode anzuzeigen. Häufig kommt diese Funktion bei der Durchblutungsbeurteilung von Tumoren zum Einsatz^{63, 134}.

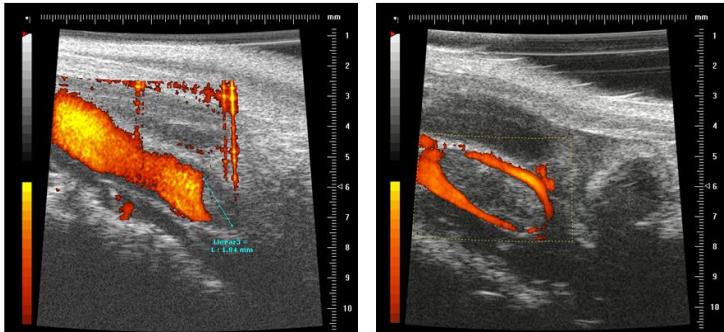


Abbildung 12: Farbkodierte Doppler-Sonographie der *Vena cava caudalis* mit gebildetem Thrombus.

Darstellung der *Vena cava* nach Ligatur mit Hilfe der farbkodierten Doppler-Sonographie. Power Doppler Aufnahme eines stenosierten Gefäßes mit der Darstellung des noch im Gefäß vorhandenen Flusses und eines sehr kleinen Thrombus (linkes Bild). Auf dem rechten Bild ist ein größerer Thrombus mit umgebendem Blutfluss gezeigt.

5.3 Darstellung der *Vena cava caudalis* bei der Maus

Nach Ablegen der Maus mit Hilfe der Isoflurannarkose und Fixierung auf dem beheizbaren Untersuchungstisch wurde kontrolliert, ob sich der abdominale Schallbereich, welcher sich vom Sternum bis zum Präputium erstreckte, ohne jeglichen Fellkontakt war. Tiere, die 24 oder 48 Stunden nach der Operation geschallt wurden, mussten nicht nochmals enthaart werden. Es folgte die Applikation von erwärmtem Ultraschallgel (dieses sollte möglichst luftblasenfrei sein, um eine gute Ankopplung zu gewährleisten) auf den Schallbereich. Der Ultraschallkopf wurde mit Hilfe der Haltevorrichtung vorsichtig abgesenkt. Dabei wurde stets die Darstellung im B-Mode betrachtet, um eine übermäßige Kompression der Organe zu verhindern. Zuerst wurde versucht, die *Aorta abdominalis* in ihrer Längsachse darzustellen. Lokalisation der Aorta und Erfassung des Ultraschallsignals anhand der markanten Pulsation und geringen Komprimierbarkeit erleichterte das nachfolgende Auffinden und die Darstellung der *Vena cava caudalis*. Zur Kontrolle wurde die Flussgeschwindigkeit mit Hilfe des Farb-Dopplers im Gefäß bestimmt. Die *Vena cava caudalis* befindet sich auf der rechten Seite des Versuchstieres; dementsprechend wurde der Schallkopf nach Auffinden der *Aorta abdominalis* in den rechten Bereich verlagert. Zunächst wurde die Ligaturstelle aufgesucht, die leicht an der Verengung

der Vene zu erkennen war. Im kaudalen Bereich hinter der Ligatur wurde das Gefäß in der Länge dargestellt. Mit Hilfe des Kompressionstestes konnte überprüft werden, ob sich ein Thrombus in dieser Region gebildet hatte und wie groß er sich im Gefäß darstellte.

Danach wurden die Parameter wie Thrombenfläche, -größe und -breite bestimmt. Konnte im Gefäß kein Thrombus nachgewiesen werden, so wurde die Anzahl der zuführenden Gefäße bestimmt und in diesen mit Hilfe der Duplex-Sonographie die Flussgeschwindigkeit am Übergang zur *Vena cava caudalis* ermittelt.

Folgenden Parameter wurden bei jeder sonographischen Untersuchung aufgezeichnet:

- Länge und Breite (mm) sowie Fläche (mm²) des Thrombus
- Einmündung der Seitenäste im Abstand zur Ligaturstelle (mm)
- Flussgeschwindigkeit in den Seitenästen (mm/sec)

6. Präparation von Blut, *Vena cava caudalis* und Thrombengewebe

Ein wichtiger Aspekt der Proben- und Datengewinnung ist die Präparation der zu untersuchenden Organe. Diese Probengenerierung erfolgte für FACS-Analysen und RNA-Genexpressions-Analysen, um eine Aussage über infiltrierte Leukozytenpopulationen und Zytokinmuster treffen zu können. In dieser Arbeit fanden Blutproben, das Gewebe der *Vena cava caudalis* und das Gewebe des entstandenen Thrombus Verwendung.

6.1 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte unter tiefer Isoflurannarkose durch kardiale Punktion des rechten Ventrikels. Hierbei wurde unterhalb des *Sternum* ein minimaler Hautschnitt durchgeführt und das Zwerchfell eröffnet, um einen besseren Blick auf den rechten Ventrikel des Herzens zu erhalten. Die vorbereitete 1 ml Spritze enthielt 100 µl Heparin (1:6 verdünnt mit steriler Kochsalzlösung) und die Punktion erfolgte mit einer 23G Kanüle. Es wurde das maximal mögliche Blutvolumen in die Spritze aufgezogen und das Tier somit durch die finale Blutentnahme getötet. Die Lagerung der entnommenen Blutprobe erfolgte bis zur weiteren Verarbeitung bei Raumtemperatur.

6.2 Tötung der Maus und Präparation der *Vena cava caudalis*/Extraktion des Thrombenmaterials

Durch Inhalationsnarkose mit Isofluran wurde die Maus in eine tiefe Narkose versetzt und diese bis zum Tod durch Ausbluten aufrechterhalten. Vorbereitend zur Präparation der *Vena cava caudalis* wurde eine Perfusion des Gesamtorganismus durchgeführt. Hierzu wurde der Brustkorb des Tieres vollständig eröffnet, um eine bessere Sicht auf das Herz zu bekommen. Der rechte Ventrikel wurde durch eine kleine Inzision seitlich eröffnet und über den linken Ventrikel wurde mit Hilfe einer 30G Nadel 5 ml kaltes PBS langsam injiziert. Der Vorteil bestand in der besseren Sicht bei der Präparation der *Vena cava caudalis*, da die Perfusion ein vollständiges Ausbluten des Tieres bewirkte.

Die Präparation der Vene folgte dem gleichen Schema wie in der Operationsmethode beschrieben (siehe Kap. 3). Durch vorsichtiges Spreizen an den seitlichen Wänden des Gefäßes führte dies zu einer Auslösung aus dem restlichen Gewebeverband. Im kaudalen Bereich wurden die dort vorhandenen Lymphknoten stumpf abpräpariert. Es folgte eine Inzision vor dem Bereich der Aufzweigung in die Femoralvenen, sowie im kranialen Bereich oberhalb der Ligaturstelle. Das extrahierte Gefäß wurde dann auf einer mit PBS angefeuchteten Mullkompressen der Länge nach eröffnet und der Thrombus vorsichtig von der Venenwand gelöst. Die Adhäsion des Thrombenmaterials nahm mit zunehmender Verweildauer im Gefäß deutlich zu, die Trennung der beiden Strukturen unter dem Mikroskop war jedoch ohne weiteres möglich. Der Faden an der Ligationstelle wurde vorsichtig entfernt und beide Gewebeproben (*Vena cava* und Thrombus) wurden in kaltem KH-Puffer bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

6.3 Bestimmung des Thrombengewichtes

Der Thrombus wurde vorsichtig auf Zellstoff abgetupft und dann in einem leeren vortarierten 1,5 ml Eppendorfgefäß zur Bestimmung des Feuchtgewichtes auf einer Feinwaage gewogen. Des Weiteren wurden die Länge des Thrombus sowie dessen Breite an der dicksten Stelle aufgezeichnet.

7. Analyse mittels Durchflusszytometrie

7.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die FACS-Analyse oder auch als „fluorescence-activated cell sorting“ bezeichnete Methode bietet die Möglichkeit, Zellen in Abhängigkeit von ihrer Größe, Gestalt und spezifischer immunologischer Markierung zu differenzieren und optisch zu separieren. Hierbei werden optische Signale detektiert, die beim Durchlaufen der Zelle durch einen Laserstrahl entstehen. Für jede gemessene Zelle werden die Intensität des Vorwärtsstreulichtes (engl. forward scatter), des Seitwärtsstreulichtes (engl. sideward scatter) und der vorhandenen Fluoreszenz aufgezeichnet. Die grafische Darstellung dieser Daten erfolgt in einem Punktehistogramm. Für die Beurteilung der Größe und Granularität werden auf der x-Achse das Vorwärtsstreulicht (Zellgröße) und auf der y-Achse das Seitwärtsstreulicht (Granularität) dargestellt (Abb. 13).

Bei der Durchflusszytometrie kommt auch Fluoreszenzlicht zum Einsatz. Zunächst werden Zellen oder bestimmte zelluläre Oberflächenantigene mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markiert. Die verwendeten Fluorochrome lassen sich dabei bei einer jeweils spezifischen Wellenlänge maximal anregen und emittieren dann energieärmeres, langwelligeres Fluoreszenzlicht in einem begrenzten Wellenlängenbereich. So weist jedes Fluorochrom ein charakteristisches Emissionsspektrum auf, was eine gleichzeitige Erfassung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe ermöglicht. Grafisch kann das dadurch erreichte zelluläre Verteilungsmuster auch in einem Punktehistogramm dargestellt werden. Für die Analyse einer Blutprobe etwa ergibt sich folgende Darstellung (Abb. 13).

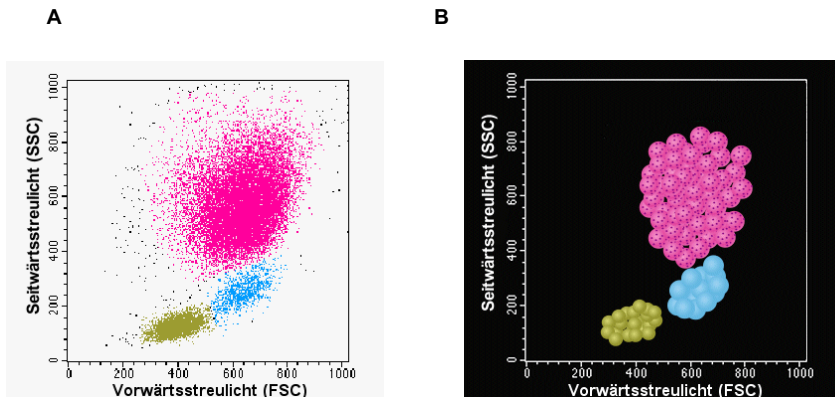


Abbildung 13: Streulich Dot-Plot, Durchflusszytometrie, Blutzellen im SSC/ FSC.

Partikel mit ähnlichen Eigenschaften häufen sich im gleichen Bereich an. Kleine Zellen wie etwa Lymphozyten mit geringer Größe und geringer Granularität sammeln sich im unteren Bereich, dargestellt in grün. Die blaue Population spiegelt die Verteilung von Monozyten wieder. Im oberen Bereich befinden sich die großen Zellen mit zahlreichen Granula, wie etwa Granulozyten, hier dargestellt in rot. **(A)** Punkthistogramm der Zellverteilung im SSC/FSC, **(B)** Dreidimensionale Darstellung der Größe und Granularität von Zellen im Blut, Lymphozyten (grün), Monozyten (blau), neutrophile Granulozyten (rot). (Quelle Bilder: www.med4you.at)

7.2 Aufarbeitung der Proben zur Gewinnung verschiedener Leukozytenpopulationen

7.2.1 Aufarbeitung der Venen

Für die Isolierung der in die Gefäßwand migrierten Leukozytenpopulationen wurde zur Verarbeitung der *Venae cavae* ein Collagenase Typ II/DNase-I Gemisch für die enzymatische Spaltung verwendet. Nach Entnahme der Gefäße wurden diese in KH-Puffer (Tab. 10) bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert. Der Collagenase Typ II/ DNase-I Ansatz (1 mg/ml Collagenase Typ II und 50 µg/ml DNase-I) erfolgte frisch und wurde auf Eis gelagert, um eine vorzeitige Aktivierung der Enzyme zu unterbinden. Zunächst wurden die Venen einzeln in ca. 250 µl der Enzymlösung mit Hilfe einer Rasierklinge mechanisch zerkleinert. Danach erfolgte die Zugabe des Lysates zum restlichen Volumen von 750 µl Enzymlösung. Bei 37°C wurden die Venen in einem Thermomixer bei 500 rpm für 14 Minuten inkubiert.

Für die Markierung mit Antigen-spezifischen Antikörpern (Fluorochrom-gekoppelt) sowie für die spätere Analyse im Durchflusszytometer war es essentiell, dass keine größeren Gewebestücke im Lysat vorhanden waren. Deswegen erfolgte im nächsten Schritt die Abtrennung der größeren Bestandteile mittels Zellsieb (Porenweite 70 μm) und Waschen des Lysates mit Pufferlösung (PBS + 2 % FCS). Um eine effektive Ausbeute an migrierten Leukozyten aus dem Venengewebe zu erhalten, wurde zusätzlich mit dem Stempel einer 1 ml Spritze das restliche Gewebe im Zellsieb mechanisch zerrieben und insgesamt mindestens dreimal mit Pufferlösung nachgespült. Das gesamte Volumen von ca. fünf ml wurde dann in 15 ml Röhrchen überführt und bei 300 g für fünf Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand nach Zentrifugation wurde vorsichtig abgenommen und das Zellpellet in 200 ml FACS I Pufferlösung (Tab. 10) aufgenommen. Die weitere Verarbeitung der Zellproben erfolgte in einer 96 well Rundbodenplatte.

Vorbereitend für die Markierung mit Antikörpern wurden zunächst alle nicht spezifischen Bindungsstellen unter Verwendung des FC-Blocks (dieser reagiert mit extrazellulären Domänen von Maus Fc γ III und Fc γ II) blockiert. Hierzu wurde die Zellsuspension in der 96 well Platte zentrifugiert (300 g/ fünf Minuten/ 4°C) und nach Verwerfen des Überstandes mit 10 μl des verdünnten FC-Blocks (1:50 in FACS I Puffer) für 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde die Reaktion mit 100 μl FACS I Puffer gestoppt und durch Zentrifugation erneut ein Zellpellet gewonnen.

Die immunologische Markierung der Proben erfolgte durch Zugabe von 20 μl eines Antikörper Mastermixes (s. Antikörper Tab. 8) zum Zellpellet. Nach der 20-minütigen Inkubation bei 4°C wurde durch Zugabe von 200 μl FACS I Puffer ein Waschschritt eingeleitet, um ungebundene Antikörpermoleküle zu eliminieren. Durch Zentrifugieren der Platte konnte erneut ein Pellet gewonnen werden; dieses wurde vorsichtig in 200 μl FACS II Puffer aufgenommen und in ein FACS-Röhrchen überführt. Die Messung der Probe erfolgte innerhalb der nächsten zwei Stunden. Die Proben wurden bis zur Messung dunkel gelagert, um eine Abschwächung der Fluoreszenzsignale zu vermeiden.

7.2.2 Aufarbeitung der Thromben

Die Aufarbeitung des Thrombenmaterials erfolgte zunächst mechanisch. Das Material wurde mit Hilfe des Stempels einer 1 ml Spritze durch ein 40 µm Zellsieb gedrückt und die Strukturen $\leq 40 \mu\text{m}$ mit PBS/FCS in ein darunter stehendes 50 ml Röhrchen gespült. Das aufgefangene Gemisch wurde dann zur Pelletgewinnung sechs Minuten bei 300 g und 4°C zentrifugiert. Da die im Thrombenmaterial vorhandenen Erythrozyten einen störenden Effekt auf die FACS-Messung der Proben haben, wurden die gewonnenen Zellpellets in 100 µl destilliertem Wasser für 10 Sekunden resuspendiert, um eine Lyse der enthaltenen Erythrozyten hervorzurufen. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte mit zwei ml PBS/FCS. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 150 µl FACS I Puffer gelöst und in eine 96 well Rundbodenplatte überführt. Die Markierung der Zellen erfolgte wie bei der Venenaufarbeitung, wobei der jeweils gleiche Antikörper-Mastermix zum Einsatz kam.

7.2.3 Aufarbeitung des Blutes

Die Analyse der verschiedenen Zellpopulationen erfolgte aus heparinisiertem Vollblut. Es wurden pro Probe 40 µl in ein FACS-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 1 µl FC-Block wurden die Proben für 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Danach wurden die entsprechenden Fluorochrom-markierten Antikörper zugesetzt (Tab. 8). Durch vorsichtiges Vortexen wurde eine Mischung aller Komponenten erreicht und es folgte ein weiterer Inkubationsschritt für 20 Minuten bei 4°C. Zum Abstoppen der Markierungsreaktion wurden zwei ml BD FACS lysing solution (Verdünnung 1:10 mit Aqua dest) zugegeben. Durch die Zugabe dieser Lösung und einer Einwirkzeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur kam es zur Lyse der vorhandenen Erythrozyten. Danach wurden die Proben für fünf Minuten bei 500 g und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS (ca. zwei ml) und nochmaliger Zentrifugation wurden die abzentrifugierten Pellets in 200 µl PBS gelöst und noch am gleichen Tag einer FACS-Analyse unterzogen.

7.2.4 Aufarbeitung des Blutes zur Analyse von apoptotischen Zellen

Bei der Apoptose handelt es sich um einen selbstinduzierten Zelluntergang, der sowohl in der Embryogenese vorkommt als auch für den physiologischen Zelltod in

einem multizellulären Organismus verantwortlich ist. Dieser Zelltod wird u.a. in nicht reparaturfähigen, mutierten Zellen oder in Zellen, die ihre Funktionalität verloren haben, hervorgerufen^{9, 90}. Es kommt zu morphologischen Veränderungen der Zelle, wobei der Verlust der intakten Plasmamembran zu den ersten Anzeichen einer Apoptose zählt. Hierbei kommt es zu einer Verschiebung des Membranphospholipides Phosphatidylserin (PS) aus der inneren Lipidschicht in die äußere Lipidschicht des Membran „Bilayers“, wodurch die Phagozytose der absterbenden Zelle induziert werden soll. An das transferierte PS kann man nun Annexin V anlagern. Annexin V stellt ein Phospholipidbindendes Protein dar und weist eine hohe Affinität zu PS auf. Da Annexin über eine grünliche Autofluoreszenz verfügt, ist es möglich, Zellen im FACS darzustellen, die sich im apoptotischen Stadium befinden.

Für den Nachweis apoptotischer Zellen im Blut mussten zuerst die verschiedenen zellulären Komponenten des Blutes voneinander getrennt werden. Dies erfolgte mit Hilfe eines Saccharose-Dichtegradienten. Für die Aufarbeitung wurden vorsichtig 500 µl heparinisiertes Vollblut auf den vorgefertigten Gradienten (1 ml Histopaque 1119[®] überschichtet mit 1 ml Histopaque 1077[®]) pipettiert. Danach erfolgte die Zentrifugation mit 700 g für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Unter Verwendung dieses Doppelgradienten war es möglich, vitale mononukleäre Zellen und Granulozyten zu separieren. Nach der Zentrifugation ließen sich vier verschiedene Phasen unterscheiden, und zwar von oben beginnend Blutplasma, gefolgt von der Phase der mononukleären Zellen, der Phase der Granulozyten sowie pelletierte Erythrozyten (Abb. 14).

Im nachfolgenden Schritt wurden die Phasen der mononukleären Zellen und Granulozyten abpipettiert und zusammen in ein Röhrchen mit 10 ml PBS überführt. Es folgte eine Zentrifugation bei 200 g für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, die Zellen wurden nochmals in 10 ml PBS resuspendiert, gefolgt von einem weiteren Zentrifugationsschritt. Das Zellpellet wurde dann in 1 x Annexin V Bindungspuffer gelöst und die vorhandene Zellzahl bestimmt.

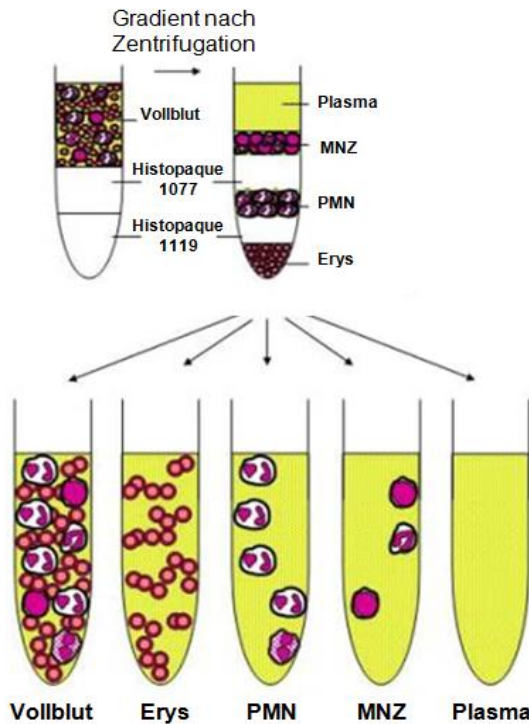


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Aufarbeitung von Vollblut mit Histopaque 1119/1077.

Durch die Aufarbeitung mit Hilfe eines Dichtegradienten bestehend aus Histopaque 1119 und 1077 ergaben sich aus dem Vollblut insgesamt vier zu isolierende Phasen. Es konnten Erythrozyten (Erys), Granulozyten (PMN), mononukleäre Zellen (MNZ) und Plasma gewonnen werden.

Für die Markierung (FACS-Analyse) wurden folgende Fluorochrome mit Autofluoreszenz bzw. Antikörper verwendet:

- Annexin V-FITC
- Totzellmarker 7-AAD
- anti Maus CD 45 APC eFluor 780 (Verdünnung 1:40)

Für die Färbung wurde eine Suspension mit definierter Zellzahl von 1×10^6 Zellen/ml hergestellt. Pro Probe wurden für die Färbung jeweils 100 μ l dieser Zellsuspension

verwendet. Es folgte die Zugabe von 10 µl Annexin V Lösung, sowie 5 µl 7-AAD Lösung und 2 µl eFluor 780 gekoppelter anti-Maus CD45 Antikörper. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Markierung durch Zugabe von 400 µl Annexin V Bindungspuffer gestoppt. Die Messung wurde innerhalb einer Stunde durchgeführt.

8. mRNA-Analyse mittels quantitativer Real-Time-PCR (qRT-PCR)

8.1 Prinzip der RNA-Analyse

Die Analyse der Boten-Ribonukleinsäure (engl. Messenger RNA) gibt Aufschluss über Expression bestimmter Gene im zu untersuchenden Gewebe. Mit Hilfe der qRT-PCR (quantitative Polymerase-Kettenreaktion mit vorangegangener, reverser Transkription) sollten Expressionsunterschiede auf mRNA-Ebene im Venengewebe und Thrombengewebe der verschiedenen Mausstämmen analysiert werden.

8.2 Prinzip der qRT-PCR

Bei der Polymerase-Kettenreaktion(PCR) handelt es sich um eine sensitive Methode zur Analyse von Nukleinsäure-Sequenzen. Nach vorangegangener Spaltung der DNA in Einzelstränge können Primer hierbei an spezifische Sequenzen binden und es folgt eine Anlagerung komplementärer Nukleotide. Durch die Anlagerung der Nukleotide wird die Zielsequenz amplifiziert, ein sich wiederholender Zyklus führt im Verlauf zu einer exponentiellen Replikation. In dieser Arbeit wurde für die quantitative Analyse der PCR-Produkte das Verfahren der reversen Transkriptase Real-Time PCR verwendet^{60, 112}. Bei dieser Untersuchungsmethode sind neben den jeweiligen Primern spezielle Sonden enthalten. Diese aus Oligonukleotiden bestehenden Sonden besitzen am 5'-Ende ein Reporter-Fluorochrom, wie zum Beispiel FAM (6-Carboxy-Fluorescein) und am 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff. Durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der verwendeten Taq-Polymerase kommt es bei fortschreitender Anlagerung komplementärer Nukleotide zur Abspaltung des gebundenen Reporterfarbstoffes. Die Exonukleaseaktivität der Polymerase führt dabei zur Hydrolyse der Sonde und somit kommt es zu einer steigenden Reporter-Fluoreszenz (Abb. 15). Während die Fluoreszenz der intakten Sonde bei einer Wellenlänge von 488 nm durch die räumliche Nähe des Quencher- zum Reporter-Farbstoff unterdrückt wird, ist dies bei der Abspaltung durch die Taq-Polymerase nicht mehr gegeben. Diese Fluoreszenz kann detektiert werden und ist ein Maß für

das Ausmaß der Amplifizierung, die in Abhängigkeit der ursprünglich vorhandenen DNA-Menge erfolgte.

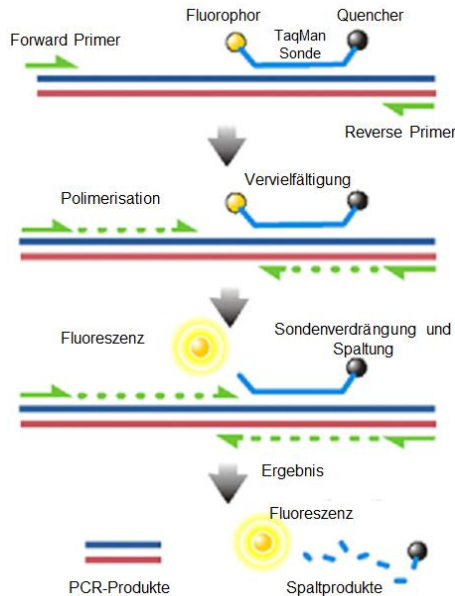


Abbildung 15: Funktion einer TaqMan Sonde.

Schematisch dargestellte Funktion einer TaqMan Sonde. Die Freisetzung des an die Sonde gebundenen Reporter-Fluoreszenzfarbstoffes (Fluorophor) ist nur bei erfolgreicher Vervielfältigung des gewünschten DNA-Abschnittes gegeben. Während die Fluoreszenz der intakten Sonde bei einer Wellenlänge von 488 nm durch die räumliche Nähe des Quencher-zum Reporter-Farbstoff (Fluorophor) unterdrückt wird, ist dies bei der Abspaltung durch die Taq Polymerase nicht mehr gegeben. (Quelle: www.medicinische-genetik.de)

8.3 RNA-Isolierung

Zur Vorbereitung der tiefgefrorenen Gewebe wurden diese mit Hilfe eines Eppendorf-Mörsers unter Verwendung von flüssigem Stickstoff zu einem Pulver gemörsert. Dieser Schritt war notwendig, um ein Lysieren der Zellverbände zu erleichtern. Wichtig dabei war es, ein Auftauen der Gewebeproben zu vermeiden, um die Aktivierung enthaltener RNAsen zu unterbinden. Um eine Zellyse durchzuführen, wurden die Venen mit je 300 µl und die Thromben mit je 400 µl Git-Puffer für eine

Stunde bei -20°C inkubiert. Das im Git-Puffer enthaltene Guanidiniumisothiocyanat führte zu einer Lyse der Zellen sowie zu einer Inaktivierung enthaltener RNAsen. Danach erfolgte die Zugabe von 0,1 Vol Na-Acetat und 1,0 Vol Phenol. Durch kräftiges Vortexen wurde eine Mischung aller Komponenten erreicht. Nach Zugabe von 0,5 Vol Chloroform/Isomylalkohol, erneutem kräftigen Vermischen und einer 15-minütigen Inkubation auf Eis konnte durch Zentrifugation bei 13000 rpm für 20 Minuten bei 4°C eine Phasentrennung von Proteinen, DNA und RNA erreicht werden. In der unteren Chloroformphase waren die Proteine enthalten, die Interphase enthielt die DNA und in der oberen wässrigen Phase war die RNA enthalten. Diese wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und 1,0 Vol kaltes Isopropanol zugegeben. Nach gründlichem Vermischen zur Präzipitation der RNA folgte eine Inkubation für mindestens 60 Minuten bei -20°C mit anschließender Zentrifugation für 20 Minuten bei 13000 rpm und 4°C . Der entstandene Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das vorhandene Pellet mit 300 μl 80% Ethanol gewaschen. Danach wurde die Probe nochmals zentrifugiert (fünf Minuten bei 13000 rpm) der Überstand wurde verworfen und das gebildete Pellet im Probengefäß wurde für fünf Minuten umgedreht auf einem Zellstofftuch getrocknet. Nach Zugabe von 30 μl DEPC-Wasser konnten die RNA-Konzentrationen photometrisch bestimmt werden.

8.4 Bestimmung der RNA-Konzentration

Unter Verwendung eines UV-Vis-Spektrophotometers wurde die Konzentration an RNA in der jeweiligen Probe bestimmt (verwendete Wellenlänge 260 nm). Für die Messung wurde 1 μl unverdünnte Probe benötigt.

8.5 Durchführung der qRT-PCR

Zur Durchführung der Real-Time PCR wurden 0,25 μg isolierte RNA (2,5 μl mit einer Konzentration von 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) aus der Wand der *Vena cava caudalis* bzw. dem isolierten Thrombenmaterial verwendet. Jeder Ansatz (25 μl) enthielt 12,5 μl 2-fach konzentrierten QuantiTect Probe RT PCR Master Mix, 8,5 μl RNase freies Wasser, 1,25 μl Primer (inklusive Sonde) und 0,25 μl QuantiTect Probe RT Mix sowie 2,5 μl RNA. Die Proben wurden jeweils als Dreifachbestimmung untersucht. Nach Versiegelung der Platte mit einer transparenten Folie für optische Messungen wurden die Proben im Cyclyer unter der Verwendung folgender Zyklen analysiert:



8.6 Auswertung der Ergebnisse

Für die Auswertung der Daten wurde eine relative Quantifizierung der mRNA durchgeführt. Bei dieser Methode wird die Genexpression des Zielgenes auf die eines sogenannten "house keeping Gens" (HKG), welches nicht der Regulation unterzogen ist, bezogen. Als Referenzgen für die spätere Normalisierung diente im Falle der *Vena cava caudalis* das TBP (TATA-box binding protein Gen) und für das Thrombenmaterial das β -Aktin Gen.

Ein Vorteil dieser Methode ist die Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse, da spezifische Gewebeeffekte, unterschiedliche Extraktionskoeffizienten sowie Fehler bei der Durchführung der qRT-PCR das Zielgen und das HKG gleichermaßen betreffen¹¹⁹. Für die Berechnung der Expressionsunterschiede wurde die $\Delta\Delta CP$ Methode (CP = crossing point) verwendet.

$$\Delta CP = CP \text{ Zielgen} - CP \text{ Referenzgen}$$

$$\Delta\Delta CP = \Delta \text{Behandlung} - \Delta CP \text{ Kontrolle}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta CP}$$

Hiermit ergibt sich der relative Expressionsunterschied zwischen der Behandlung und der Kontrolle (Ratio), normalisiert zum Referenzgen und bezogen auf eine Standardprobe, aus der arithmetischen Formel $RQ = 2^{-\Delta\Delta CP}$ ⁸¹.

9. Statistische Analyse

Die Darstellung der Daten erfolgte als Mittelwerte \pm SEM. Die statistische Auswertung der Daten wurde mit GraphPad Prism 6 durchgeführt. Eine Überprüfung der Normalverteilung mit Hilfe des KS Normalitätstestes war der erste Schritt. Bei einer Normalverteilung wurde im Falle von zwei zu vergleichenden Gruppen der t-Test zur Analyse verwendet. Beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde eine one way

ANOVA mit anschließendem Bonferroni's Multiple Comparison Test durchgeführt. Waren die Daten nicht normalverteilt, so wurde bei zwei Gruppen der Mann-Whitney Test durchgeführt. Handelte es sich um mehr als zwei Gruppen, so wurde auf den Kruskal-Wallis Test mit anschließendem Dunn's Multiple Comparison Test zurückgegriffen. Multiple Vergleiche wurden mittels two way ANOVA für wiederholte Messungen mit anschließendem Bonferroni post test auf signifikante Unterschiede untersucht. Ein Stern * kennzeichnet einen P-Wert von $\leq 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%), zwei Sterne ** von $p \leq 0,01$ und drei Sterne *** von $p \leq 0,001$.



Abbildung 17: Duplex-sonographische Darstellung der Flussgeschwindigkeit in der Vena cava caudalis der Maus nach Induktion einer Vena cava Ligatur.

Darstellung der Flussgeschwindigkeit ca. sechs Stunden nach Stenosierung der Vena cava caudalis mittels Duplex-Sonographie. Das Bild rechts oben zeigt die B-Mode Darstellung der Vene mit Platzierung des Messbalkens zur Aufnahme des im unteren Bereich gezeigten pulsatischen Blutflusses in der Vena cava caudalis. Gemessen an zwei verschiedenen Stellen wurde die Flussgeschwindigkeit (IVC Vel) mit der Einheit mm/s.

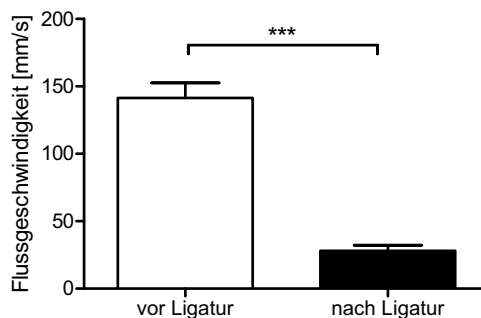


Abbildung 18: Reduktion der Flussgeschwindigkeit nach Stenosierung der Vena cava caudalis.

Flussgeschwindigkeit gemessen mittels Duplex-Sonographie in mm/s (Mittelwert ± SEM) vor und sechs Stunden nach Stenosierung der Vena cava caudalis. *** $p \leq 0,001$ (t-Test; $n=7$)

1.2 Evaluation der Vergleichbarkeit von Thrombenlänge gemessen mittels Ultraschall und nach Exaktion

Um die Messgenauigkeit mittels Ultraschall zu überprüfen, wurde die Thrombenlänge *in situ* vor der Exaktion im B-Mode bestimmt (Abb. 19, links). Die daraus ermittelten Werte wurden nach erfolgter Exaktion und Vermessung des Thrombus (Abb. 19, rechts) miteinander verglichen. Der hierfür ermittelte Korrelationskoeffizient von $r^2 = 0,9734$ ergab eine nur geringfügige Varianz der jeweils gemessenen Werte (Abb. 20).

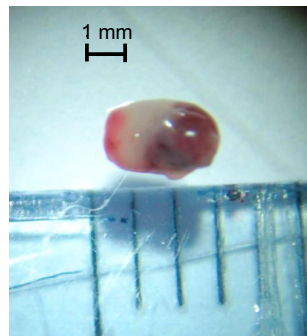
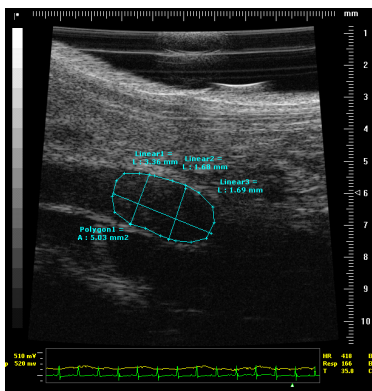


Abbildung 19: B-Mode Darstellung eines Thrombus der *Vena cava caudalis* in der Längsachse und Thrombus nach anschließender Isolation.

Darstellung eines Thrombus zwei Tage nach Ligatur (links) der *Vena cava caudalis* durch Bestimmung im Ultraschall (HFUS, „high-frequency ultrasound“) mittels B-Mode und nach erfolgter Exaktion (rechts). Die B-Mode Darstellung zeigt einen in der *Vena cava caudalis* gemessenen Thrombus mit den Messbalken für Länge und Breite sowie der Flächenmessung in der Längsachse.

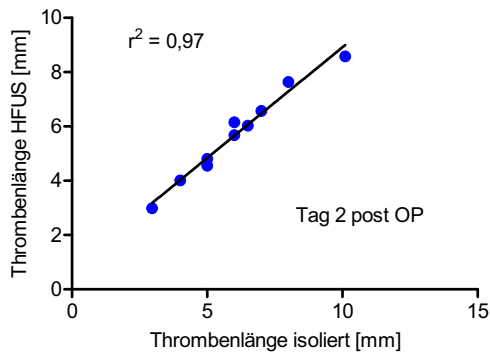


Abbildung 20: Korrelation der Thrombenlänge (Ultraschallmessung vs. isoliert).

Lineare Korrelation zwischen den durch Ultraschall (HFUS) ermittelten Thrombenlängen und den an den isolierten Thromben bestimmten Längenwerten zwei Tage nach erfolgter Ligatur (lineare Regressionsanalyse und xy Korrelation (Pearson); n=10).

2. Genauere Betrachtung des verwendeten Mausmodells und Darstellung des Einflusses venöser Seitenäste auf die Thrombenentstehung

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst untersucht, ob ein Abbinden der sichtbaren (lateralen) venösen Seitenäste der *Vena cava caudalis* zu einer konstanteren Thrombengröße sowie -bildung führt. Die Verwendung eines vaskulären Clips wurde vernachlässigt, da die Thrombusbildung ohne Induktion eines Endothelschadens im weiteren Verlauf der Studie genauer betrachtet werden sollte. Die vaskuläre Anatomie der Maus ist hoch variabel, besonders wenn man die Anzahl an Gefäßen betrachtet, die in die *Vena cava caudalis* münden (Abb. 21). Oftmals handelt es sich um ein bis zwei laterale Äste und ungefähr die gleiche Anzahl an dorsalen Ästen, welche während der Präparation nur schlecht darstellbar waren^{23, 131}.

Etwa 48 Stunden nach durchgeführter Ligatur der *Vena cava caudalis* wurden die Tiere per Ultraschall untersucht und die eingetretene Thrombusbildung sowie die anatomischen Gegebenheiten der Vene beurteilt. Sofern dorsal einmündende Gefäße sichtbar waren, wurde bei diesen der Abstand zur Ligaturstelle sowie die Flussgeschwindigkeit am Übergang in die *Vena cava* gemessen.

Die Auswertung der Daten ergab einen signifikanten Einfluss der Einmündungsstelle von Seitenästen auf die Thrombusentwicklung (Abb. 22/ 24).

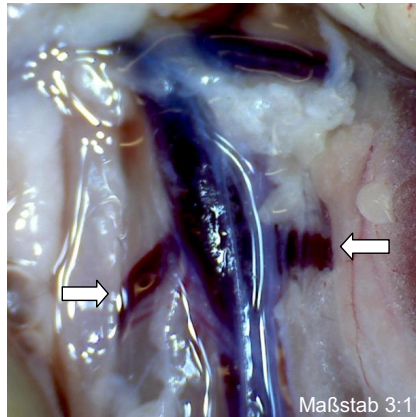


Abbildung 21: *Vena cava caudalis* in situ mit zwei lateral abgehenden Seitenästen.

Aufnahme der *Vena cava caudalis* der Maus mit zwei lateralen Seitenästen (siehe Pfeile) im Bereich unterhalb der linken Nierenvene.

Das Vorhandensein venöser Seitenäste im Bereich kaudal der Ligatur beeinflusste das Gewicht des Thrombus mit einem Bestimmtheitsmaß von $r^2 = 0,56$ und die Länge des Thrombus von $r^2 = 0,54$. Hieraus ergab sich in beiden Fällen ein signifikanter Einfluss auf Länge und Gewicht ($p \leq 0,001$) (Abb. 22). Alle Messpunkte, die in Abbildung 22 und 23 direkt auf der X-Achse liegen, beziehen sich auf Tiere, bei denen keine Thrombenentwicklung stattfand. Die Messung der Flussgeschwindigkeit im Seitenast am direkten Übergang in die *Vena cava caudalis* mittels Duplex-Sonographie ergab jedoch keinen signifikanten Einfluss ($r^2 = 0,008$; $r^2 = 0,004$) auf Thrombengewicht und -länge (Abb. 23).

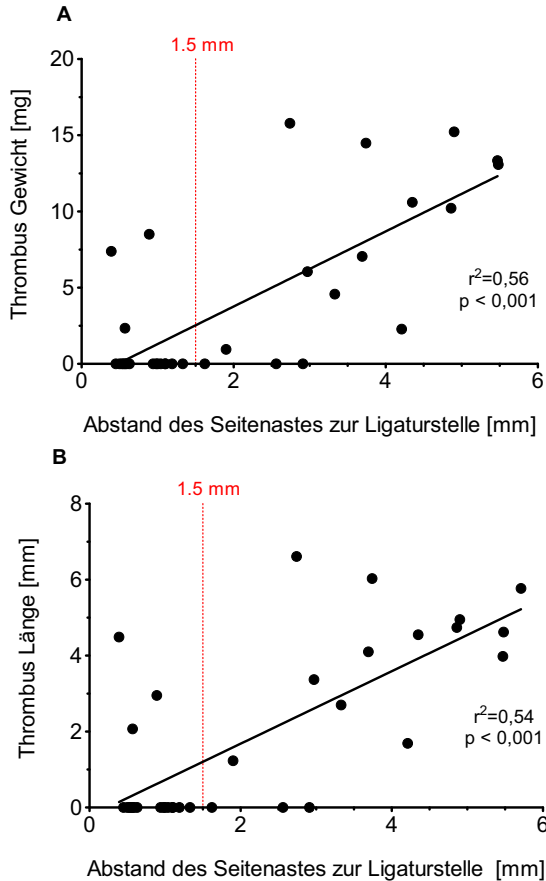


Abbildung 22: Korrelation von Thrombengewicht zum Abstand des Seitenastes/ Korrelation Thrombenlänge zum Abstand des Seitenastes.

(A) Einfluss der venösen Seitenäste auf das Gewicht des Thrombus bezogen auf den Abstand zur Insertionsstelle (lineare Regressionsanalyse und xy Korrelation (Pearson); $n=34$). Die Symbole repräsentieren dabei einzelne Versuchstiere. **(B)** Korrelation zwischen der Thrombenlänge und der Insertionsstelle von venösen Seitenästen (Lineare Regressionsanalyse und xy Korrelation (Pearson); $n=34$). Die Symbole repräsentieren dabei einzelne Versuchstiere, alle Daten wurden in die Berechnung der Regressionsgeraden einbezogen.

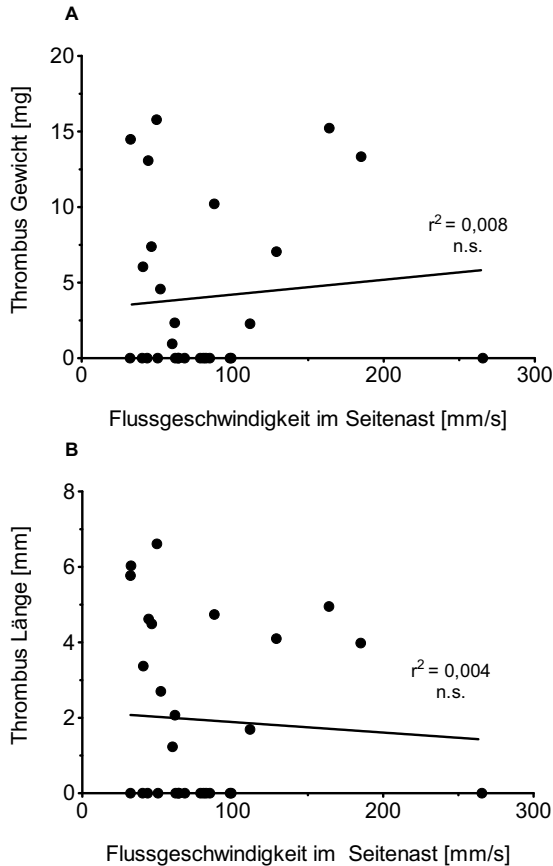


Abbildung 23: Korrelation von Thrombengewicht bzw. Thrombenlänge zur Flussgeschwindigkeit des Blutes.

Einfluss der Flussgeschwindigkeit im venösen Seitenast auf Gewicht **(A)** und Länge **(B)** des Thrombus gemessen am direkten Übergang in die *Vena cava caudalis* (lineare Regressionsanalyse und xy Korrelation (Pearson); $n=28$). Die Symbole repräsentieren dabei einzelne Versuchstiere, alle Daten wurden in die Berechnung der Regressionsgeraden einbezogen.

Anhand dieser Daten ergab sich ein Einfluss auf die Thrombusbildung, ausschließlich hervorgerufen durch den Abstand der einmündenden Gefäße von der Ligaturstelle, nicht jedoch deren Flussgeschwindigkeit. Betrachtet man die ermittelten Daten genauer, so lässt sich eine Erklärung für das Ausbleiben einer

Thrombusbildung formulieren. Sofern der Insertionsbereich venöser Seitenäste in die *Vena cava caudalis* 1,5 mm unterschreitet, führte dies häufig nicht zu einer Thrombenbildung (Abb. 24).

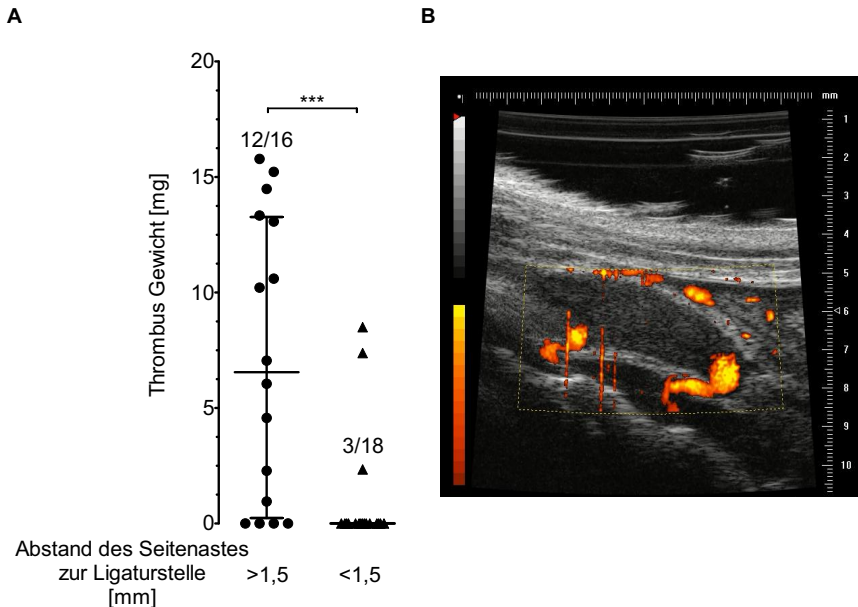


Abbildung 24: Einfluss des Abstandes vom Seitenast zur Ligaturstelle.

(A) Die in der Tabelle ermittelten Daten basieren auf Ultraschalluntersuchungen, welche an Tag zwei nach Ligatur durchgeführt wurden. Hierbei konnte ein hoch signifikanter Einfluss ($p \leq 0,001$) des Abstandes von venösen Seitenästen zur Ligaturstelle dargestellt werden (Median und Interquartilsabstand, Mann-Whitney Test; $n=34$). Die Symbole repräsentieren dabei einzelne Versuchstiere. In der ersten Gruppe mit einem Seitenastabstand größer 1,5 mm fand die Thrombusentwicklung in 12 von insgesamt 16 Tieren statt; in der zweiten Gruppe mit einem Seitenastabstand unter 1,5 mm fand die Thrombusentwicklung in 3 von insgesamt 18 Tieren statt. **(B)** Duplex-sonographische Darstellung der *Vena cava caudalis* mit einmündendem Seitenast direkt kaudal der Ligaturstelle bei einem Abstand kleiner als 1,5 mm.

2.1 Die Ligation venöser Seitenäste beeinflusst weder die Prävalenz der Thrombenbildung noch deren Gewicht

Ein Einfluss venöser Seitenäste auf die Thrombusentwicklung im Stenose Modell der *Vena cava caudalis* konnte im vorherigen Abschnitt bereits gezeigt werden. Nun stellte sich die Frage, ob ein Abbinden der lateralen Seitenäste der *Vena cava caudalis* zu einer konstanteren Thrombusbildung führt. Verglichen wurden insgesamt drei Gruppen. Bei der ersten Gruppe handelte es sich um scheinoperierte Tiere, bei denen eine Ligatur der *Vena cava* ausblieb. Bei der zweiten Gruppe wurde das Vorhandensein sichtbarer Seitenäste nicht weiter berücksichtigt und bei der dritten Gruppe wurden zusätzlich zur durchgeführten Stenosierung alle sichtbaren Seitenäste ligiert. Hierbei konnte lediglich ein signifikanter Unterschied zwischen der scheinoperierten Gruppe und den jeweiligen Ligationgruppen hinsichtlich der Bildung von Thromben bzw. deren Größe (Gewicht) ermittelt werden (Abb. 25).

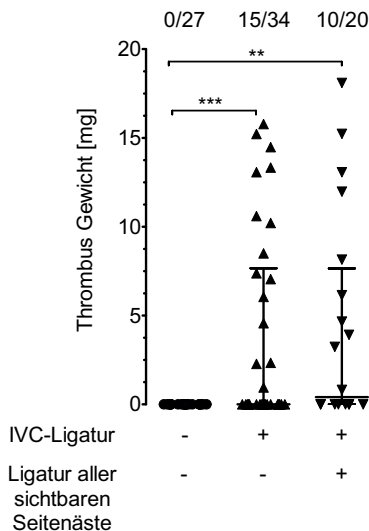


Abbildung 25: Die Ligation venöser Seitenäste beeinflusst weder das Auftreten noch das Gewicht venöser Thromben.

Die Ligation der sichtbaren Seitenäste der *Vena cava caudalis* hat keinen Einfluss auf das Gewicht der Thromben. Die Gruppen bestanden aus scheinoperierten Tieren (n=27), Tieren mit Ligatur der *Vena cava caudalis* (IVC) ohne Seitenastverschluss (n=34) und Tieren bei denen eine IVC-Ligatur mit Verschluss der Seitenäste erfolgte (n=20). Die Symbole repräsentieren dabei einzelne Versuchstiere, die Angaben über den Gruppen bedeuten gebildete Thromben/Gesamtzahl an verwendeten Tieren. (Median und Interquartilsabstand; Kruskal-Wallis Test; ** $p \leq 0,01$ / *** $p \leq 0,001$)

Vergleicht man die Daten der beiden Ligationsgruppen, so ergibt sich weiterhin eine ausgeprägte Varianz im Thrombengewicht, trotz erfolgter zusätzlicher Ligatur der lateralen Seitenäste. Dieses Ergebnis bestätigt den essentiellen Einfluss der weiterhin offenen (unangetasteten) *dorsalen* Seitenäste im Geschehen der Thrombusbildung. Ein Verschließen der sichtbaren (*lateralen*) Seitenäste und die uneingeschränkte Funktion der *dorsalen* Seitenäste führte somit zu keinem signifikanten Anstieg einer konstanteren Thrombenentstehung.

3. Analyse von Thromben- und Venengewebe hinsichtlich vorhandener Leukozytenpopulationen unter Verwendung der Durchflusszytometrie

Die bisher in der Literatur beschriebene zelluläre Zusammensetzung von Thrombenmaterial und Venengewebe basiert auf der Untersuchung histologischer Schnitte^{113, 115, 155}. Anhand dieser Methode kann keinerlei Aussage über die Vitalität der leukozytären Zellpopulationen getroffen werden. Die Kalkulation der gesamten Anzahl an Zellen bezieht sich hierbei nur auf eine Hochrechnung. Aus diesem Grund wurde die Methode der Durchflusszytometrie zur Untersuchung von Venen- und Thrombengewebe etabliert. Im Vordergrund stand die Analyse von vitalen Zellen und der gesamten Zellzahl pro mg Thrombus oder pro Venenabschnitt (Bereich zwischen Ligaturstelle und der Aufzweigung in die Femoralvenen).

3.1 Reduktion der Anzahl vitaler, CD45 positiver Zellen im Thrombengewebe im Verlauf des Auflösungsprozesses

Im Verlauf einer venösen Thrombose kommt es zum Influx von Inflammationszellen in das Venengewebe sowie zu einer Ansammlung von verschiedenen Leukozytenpopulationen im Stenosebereich der Vene¹⁵⁵. Betrachtet man die Anzahl an infiltrierten, CD45 positiven und vitalen Zellen im Thrombengewebe, so lässt sich eine deutlich Abnahme über einen Zeitraum von 21 Tagen erkennen (Abb. 26). Das mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysierte Thrombengewebe hinsichtlich Expression des Oberflächenmarkers CD45 sowie eines Todzellmarkers ergab Werte von 8816 ± 2987 Zellen/mg Thrombus an Tag 2, 3710 ± 1796 vitalen Zellen/mg Thrombus an Tag 6, 1614 ± 837 Zellen/mg Thrombus an Tag 10 und 1062 ± 420 Zellen/mg Thrombus an Tag 21 (Abb. 26).

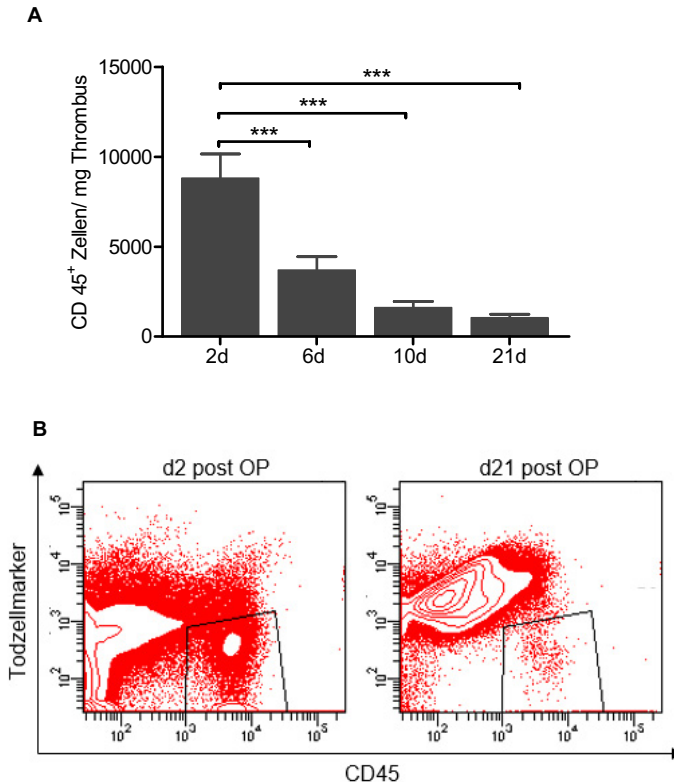


Abbildung 26: Durchflusszytometrische Analyse der Anzahl CD45 positiver, lebender Zellen im Thrombengewebe.

Die mit Hilfe der Durchflusszytometrie ermittelten Daten von Tag (d) 2 - 21 nach erfolgter Venenligatur zeigen eine deutliche Abnahme an CD45 positiven Zellen. **(A)** Abnahme der Gesamtzellzahl an CD45 positiven/lebenden (Todzellmarker negativ) Zellen im Thrombus (Mittelwerte \pm SEM, one way-ANOVA/Bonferroni's Multiple Comparison Test, $n=5$; *** $p \leq 0,001$). **(B)** Repräsentative FACS-Plots, gezeigt ist das „gate“ für die jeweils CD45 positiven/lebenden Zellen.

3.2 Analyse der vitalen leukozytären Subpopulationen im Verlauf einer venösen Thrombose

Der allgemeine Auflösungsprozess einer venösen Thrombose kann teilweise mit Vorgängen in der Wundheilung verglichen werden. Zunächst erfolgt ein Influx von neutrophilen Granulozyten, im späteren Verlauf dominieren die Monozyten/Makrophagen^{113, 115}. Die Vitalität der Zellpopulationen wurde bisher bei ver-

öffentlichen Daten zur venösen Thrombose nicht berücksichtigt; außerdem lag das Hauptaugenmerk auf den monozytären und granulozytären Zellen. In dieser Arbeit sollten daher zusätzlich die Populationen der T-Zellen allgemein, der CD4 positiven Zellen und der natürlichen Killerzellen, unter Verwendung eines Lebendfarbstoffes, untersucht werden.

3.2.1 Neutrophile Granulozyten

Basierend auf Antikörpermarkierung für die allgemeinen Leukozytenmarker CD45 und CD11b sowie das myeloische Differenzierungsantigen GR-1 konnten sowohl im Thrombus- als auch Venengewebe zuverlässig neutrophile Granulozyten detektiert werden (Abb. 27). Die quantitative Analyse zeigte einen stetigen Rückgang an neutrophilen Granulozyten im Thromben- sowie im Venengewebe. Zur Kalkulation der Daten wurde der Anteil der CD45 positiven vitalen Zellen als Ausgangswert für die prozentuale Kalkulation verwendet. Im Venengewebe fielen die Werte von $64,5 \pm 1,2 \%$ (Tag 2) über $30,0 \pm 6,0 \%$ (Tag 6) und $21,9 \pm 5,6 \%$ (Tag 10) auf $10,2 \pm 2,1 \%$ (Tag 21) ab. Wegen der hohen Varianz der absoluten Zellzahlen im Venengewebe, begründet durch die unterschiedlich große Thrombenbildung, wurden in dieser Arbeit nur die prozentualen Anteile an inflammatorischen Zellen im Venengewebe berücksichtigt. Für das Thrombengewebe konnte ein Abfall des prozentualen Anteils an neutrophilen Granulozyten von $86,7 \pm 2,9 \%$ (Tag 2) auf $62,4 \pm 0,8 \%$ (Tag 6), $40,1 \pm 5,7 \%$ (Tag 10) und letztendlich $18,1 \pm 13,0 \%$ (Tag 21) ermittelt werden. Im Vergleich dazu zeigten die absoluten Zellzahlen bezogen auf ein Miligramm Thrombengewebe einen deutlichen Rückgang von 7760 ± 1381 Zellen/mg Thrombus an Tag zwei auf 115 ± 27 Zellen/mg Thrombus an Tag 21 (Graph nicht gezeigt). Diese Analyse zeigte hohe Werte an neutrophilen Granulozyten an Tag 2 im Thromben- und Venengewebe sowie einen stetigen Abfall über einen Zeitraum von 21 Tagen.

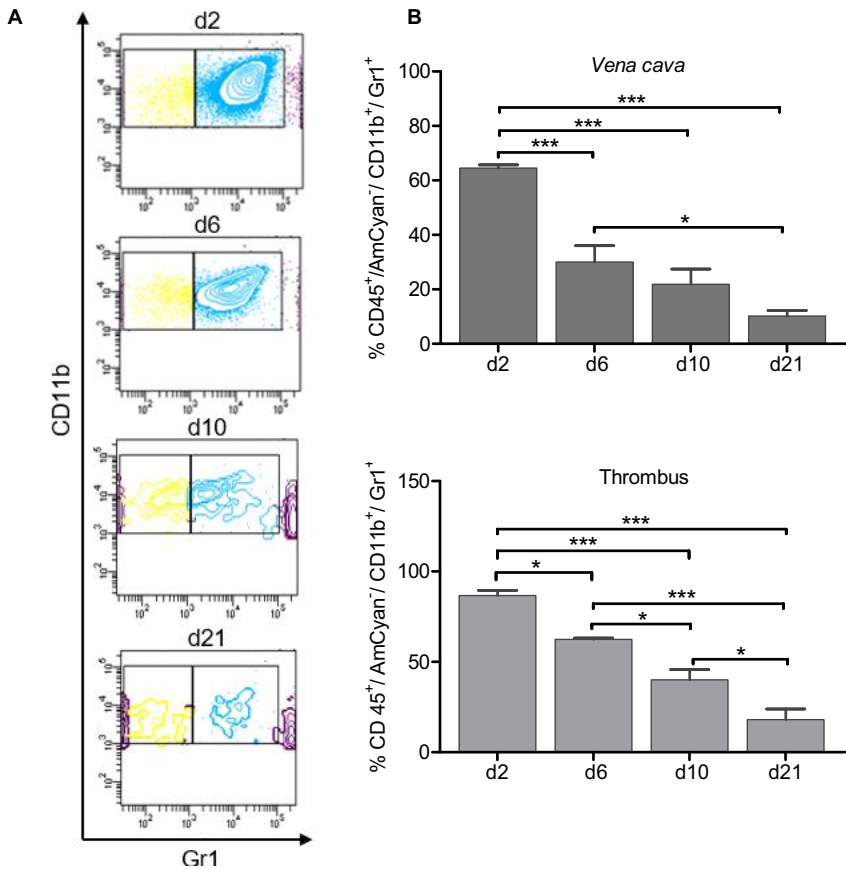


Abbildung 27: Durchflusszytometrisch bestimmter prozentualer Anteil an neutrophilen Granulozyten in der *Vena cava caudalis* und im Thrombengewebe.

Durchflusszytometrisch ermittelte prozentuale Abnahme an vitalen CD45, CD11b sowie Gr1 positiven Zellen im zeitlichen Verlauf (Tage (d) 2, 6, 10 und 21), ermittelt im Thrombenmaterial und Venensegment. **(A)** Repräsentative FACS-Plots; in Gelb dargestellt ist der Anteil an Monozyten (Gr1 negativ) und in Blau der Anteil an neutrophilen Granulozyten (Gr1 positiv). **(B)** Zusammenfassende grafische Darstellung der ermittelten Daten an Gr1 positiven Zellen (Mittelwerte \pm SEM, one way-ANOVA/Bonferroni's Multiple Comparison Test; n=5; * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$). Ein deutlicher zeitabhängiger Abfall des prozentualen Anteiles an neutrophilen Granulozyten ist in beiden Geweben erkennbar.

3.2.2 Monozyten

Auch zur Detektion der Monozyten wurde der allgemeine Leukozytenmarker CD45 und CD11b sowie das myeloische Differenzierungsantigen Gr1 verwendet. Dabei wurde diejenige Population der Zellen berücksichtigt, die für Gr1 als negativ ausgewertet wurde. In Abbildung 27 A dargestellte FACS-Plots zeigen in Gelb den ermittelten Anteil an Monozyten als CD11b positive/Gr1 negative Zellen. Die durchflusszytometrische Analyse ergab im Thrombengewebe einen prozentualen Anstieg an vitalen CD11b⁺/Gr1⁻ Zellen bis Tag 10; im Gegensatz dazu zeigten sich im Venensegment Tendenzen einer prozentualen Abnahme an vitalen Monozyten ab Tag 6 (Abb. 28). Zur Berechnung der Daten wurde der Anteil der CD45 positiven vitalen Zellen als Ausgangswert für die prozentuale Kalkulation verwendet. Es ergaben sich für die Vene Werte von $13,9 \pm 1,6$ % (Tag 2), $17,1 \pm 1,9$ % (Tag 6), $12,3 \pm 2,1$ % (Tag 10) und $10,6 \pm 1,7$ % (Tag 21). Die absoluten Zellzahlen wurden auf Grund der hohen Varianz im Venengewebe nicht weiter berücksichtigt. Für den prozentualen Anteil im Thrombengewebe wurden Werte von $2,1 \pm 0,5$ % (Tag 2), $14,9 \pm 3,9$ % (Tag 6), $18,8 \pm 2,4$ % (Tag 10) und $10,7 \pm 3,8$ % (Tag 21) ermittelt. Betrachtet man vergleichend die absoluten Zellzahlen pro Miligramm Thrombengewebe, so zeigte sich das Maximum der Population von Monozyten an Tag 6 und nicht wie in der prozentualen Kalkulation an Tag 10. Die Werte stiegen von 192 ± 48 Zellen/mg Thrombus an Tag 2 auf 992 ± 272 Zellen/mg an Tag 6 und zeigen einen Rückgang auf 302 ± 93 Zellen/mg Thrombus an Tag 10 bis auf 156 ± 63 Zellen/mg Thrombus an Tag 21 (Graph nicht gezeigt). Es ergab sich dabei ein signifikanter Anstieg von Monozyten im Thrombengewebe mit $p \leq 0,01$ an Tag 6. Ihre nicht nur prothrombotische Wirkung vor allem durch die Expression von Thromboplastin (TF; „tissue factor“) sondern auch antithrombotische Funktion durch Phagozytose von Zelltrümmern und somit fibrinolytischem Potential und Beeinflussung der Gefäßneubildung im Gewebe machen die Monozyten zu den interessantesten Zellen im Geschehen einer venösen Thrombose^{126, 137}.

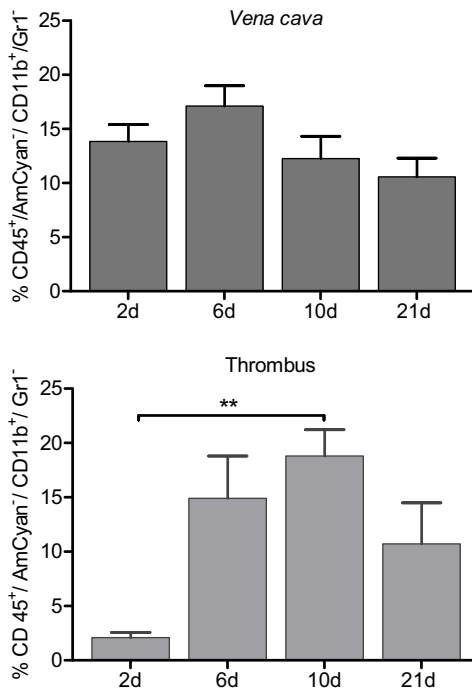


Abbildung 28: Durchflusszytometrisch bestimmter prozentualer Anteil an Monozyten in der *Vena cava caudalis* und im Thrombengewebe.

Durchflusszytometrisch ermittelte prozentuale Abnahme an vitalen CD45 sowie CD11b positiven/Gr1 negativen Zellen im zeitlichen Verlauf (Tag (d) 2, 6, 10 und 21), ermittelt im Thrombenmaterial und Venensegment. Zusammenfassende grafische Darstellung der ermittelten Daten an Gr1 negativen Zellen (Mittelwerte \pm SEM, one way-ANOVA/ Bonferroni's Multiple Comparison Test, n=5; ** p \leq 0,01).

3.2.3 T- Zellen

Das Vorhandensein verschiedener T-Zellpopulationen im Entstehungs- bzw. Auflösungsprozess venöser Thrombosen wurde bisher nicht untersucht. Dennoch tragen verschiedene T-Zellen vor allem durch die Produktion von Zytokinen zu Reparatursprozessen bei.

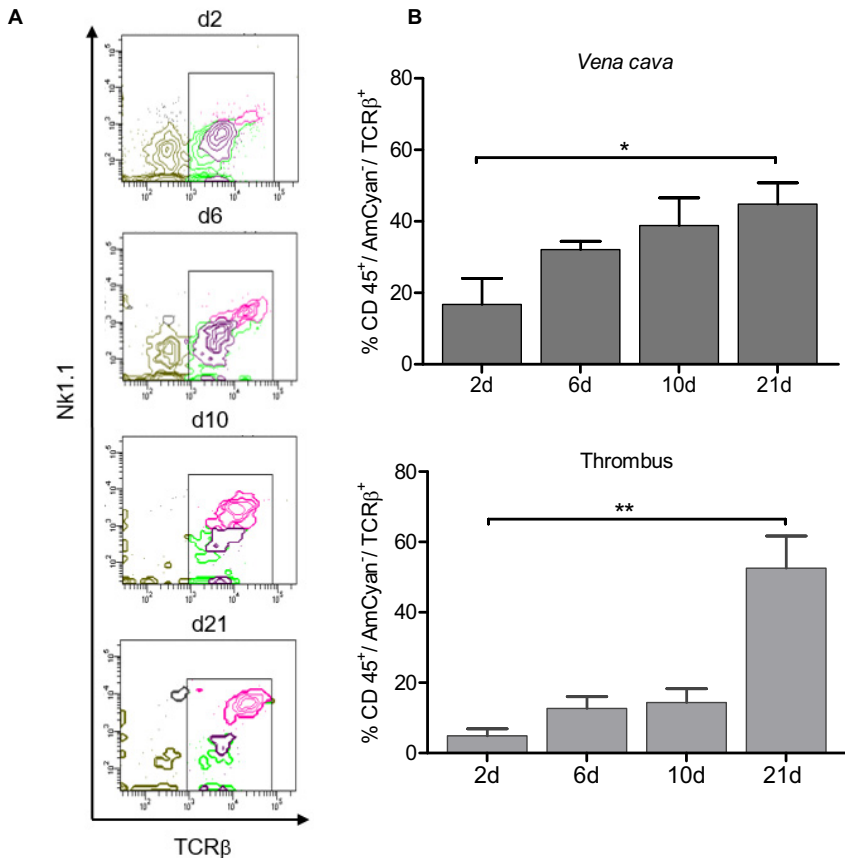


Abbildung 29: Durchflusszytometrisch bestimmter prozentualer Anteil an T-Zellen in der Vena cava caudalis und im Thrombengewebe.

Durchflusszytometrisch ermittelte prozentuale Zunahme an vitalen CD45 und TCR beta positiven Zellen im zeitlichen Verlauf (Tage (d) 2, 6, 10 und 21). Die Zellpopulation wurde nachgewiesen im Thrombenmaterial und Venensegment. **(A)** Repräsentative FACS-Plots; Anteil an TCR beta (TCRβ) positiven Zellen im Thrombengewebe **(B)** Zusammenfassende grafische Darstellung der ermittelten Daten an TCR beta positiven Zellen. (Mittelwerte ± SEM, one way-ANOVA/Bonferroni's Multiple Comparison Test, n=5; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01). Ein stetiger Anstieg war sowohl im Thromben- als auch im Venengewebe erkennbar.

Für beide Gewebeproben, Thrombenmaterial und Vena cava caudalis zeigte sich eine prozentuale Zunahme an T-Zell-Rezeptor (TCR beta) positiven Zellen im Verlauf einer Thrombose bis Tag 21 nach Durchführung einer Ligatur (Abb. 29). Die Berechnung der Daten erfolgte bezogen auf den Ausgangswert an vitalen CD45

positiven Zellen. Im Venengewebe stiegen die Werte von $16,8 \pm 7,3$ % (Tag 2) auf $32,1 \pm 2,3$ % (Tag 6), $38,8 \pm 7,8$ % (Tag 10) und auf $44,9 \pm 5,9$ % (Tag 21) an. Im Thrombengewebe wurde ein Anstieg von $4,9 \pm 2,0$ % (Tag 2) auf $12,7 \pm 3,4$ % (Tag 6), $14,4 \pm 3,9$ % (Tag 10) und schließlich auf $52,6 \pm 20,4$ % detektiert. Auch bei der Population der T-Zellen wurden nur für den Thrombus die absoluten Zellzahlen pro Miligramm Thrombengewebe bestimmt. Die ermittelten Werte (Graph nicht gezeigt) reflektieren den bereits im prozentualen Anteil gezeigten Anstieg an TCR beta positiven Zellen mit Werten von 251 ± 46 Zellen/mg Thrombus (Tag 2), 364 ± 31 Zellen/mg Thrombus (Tag 6), 283 ± 31 Zellen/mg Thrombus (Tag 10) und final 603 ± 198 Zellen/mg Thrombus (Tag 21). Dabei wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

Die im Thromben- und Venengewebe vorhandenen T-Lymphozyten lassen sich anhand der Markierung weiterer Oberflächenproteine genauer differenzieren. So exprimieren T-Helferzellen respektive T-Killerzellen außer dem TCR beta auch CD4-respektive CD8- Moleküle auf ihrer Oberfläche. In diesem Zusammenhang sind in dieser Arbeit besonders die $CD4^+$ T-Helferzellen von Interesse, da diese sich je nach Zytokinmustersignatur in T_H1 - und T_H2 -Zellen unterteilen lassen. Der prozentuale Anteil der $CD4^+$ Population, bezogen auf die TCR beta positive Population im Thrombus, zeigte im zeitlichen Verlauf eine Abnahme. Im Venengewebe nahm dieser Anteil im zeitlichen Verlauf bis Tag 10 zu, um hier den höchsten Wert zu erreichen, und fiel bis Tag 21 wieder leicht ab. Somit ergaben sich für das Venengewebe folgende Werte: $4,6 \pm 0,7$ % (Tag 2), $13,6 \pm 6,0$ % (Tag 6), $17,0 \pm 16,6$ % (Tag 10) und $13,1 \pm 5,4$ % (Tag 21). Im Thrombengewebe sank der Wert von $28,1 \pm 7,7$ % (Tag 2) über $12,6 \pm 3,2$ % (Tag 6) und $11,6 \pm 1,4$ % (Tag 10) auf $6,1 \pm 4,8$ % (Tag 21). Die absoluten Zellzahlen im Thrombengewebe (Graph nicht gezeigt) zeigten einen Rückgang von 81 ± 25 Zellen/mg Thrombus (Tag 2) auf 46 ± 13 Zellen/mg Thrombus (Tag 6), 38 ± 10 Zellen/mg Thrombus (Tag 10) und schließlich 29 ± 8 Zellen/mg Thrombus (Tag 21).

Eine weitere Zellpopulation die den T-Zellen zugeordnet wird, ist die Population der NK1.1/TCR beta positiven NKT-Zellen (NK1.1: Oberflächenmarker von NK-Zellen in Mäusen). Ausgereifte NKT-Zellen sind in der Lage massive Mengen an Interferon gamma ($IFN\gamma$) zu produzieren, aber verglichen zu anderen T-Lymphozyten sind sie ebenso in der Lage IL4 sowie zusätzliche T_H2 assoziierte Zytokine freizusetzen¹⁶⁶.

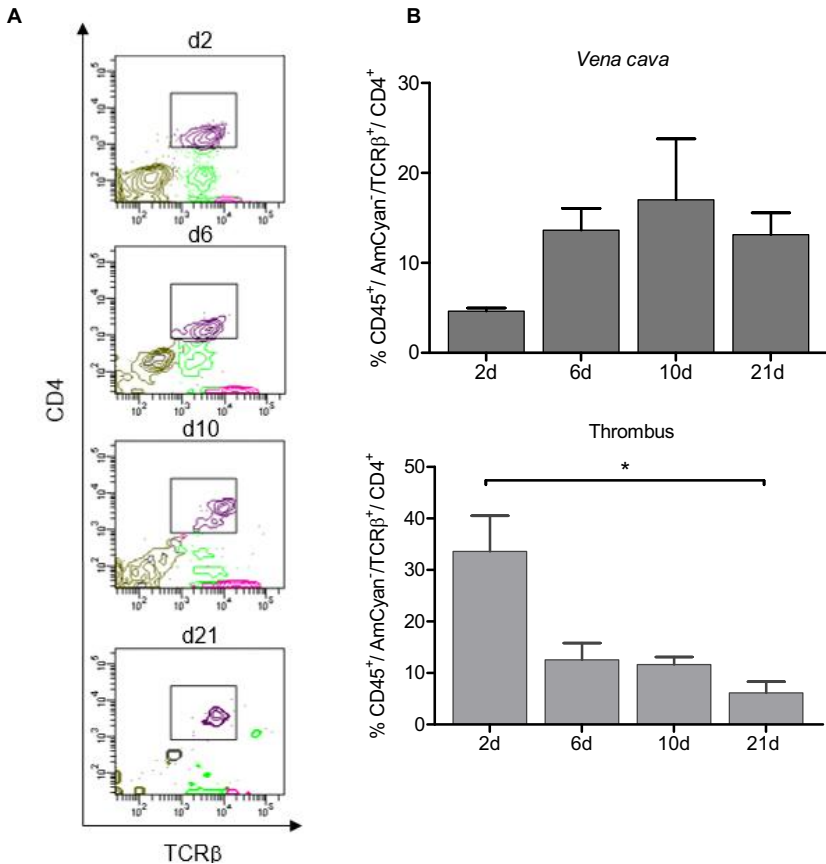


Abbildung 30: Durchflusszytometrisch bestimmter prozentualer Anteil an CD4 positiven Zellen in der *Vena cava caudalis* und im Thrombengewebe.

Durchflusszytometrisch ermittelte prozentuale Veränderung der Anzahl der TCR beta und CD4 positiver Zellen im zeitlichen Verlauf (Tage (d) 2, 6, 10 und 21) ermittelt im Thrombenmaterial und Venensegment und bezogen auf die Population der TCR beta positiver Zellen. **(A)** Repräsentative FACS-Plots; Anteil an CD4 positiven Zellen (lila) im Thrombengewebe **(B)** Zusammenfassende grafische Darstellung der ermittelten Daten an CD4 positiven Zellen. (Mittelwerte \pm SEM, one way-ANOVA/Bonferroni's Multiple Comparison Test, $n=5$; * $p \leq 0,05$)

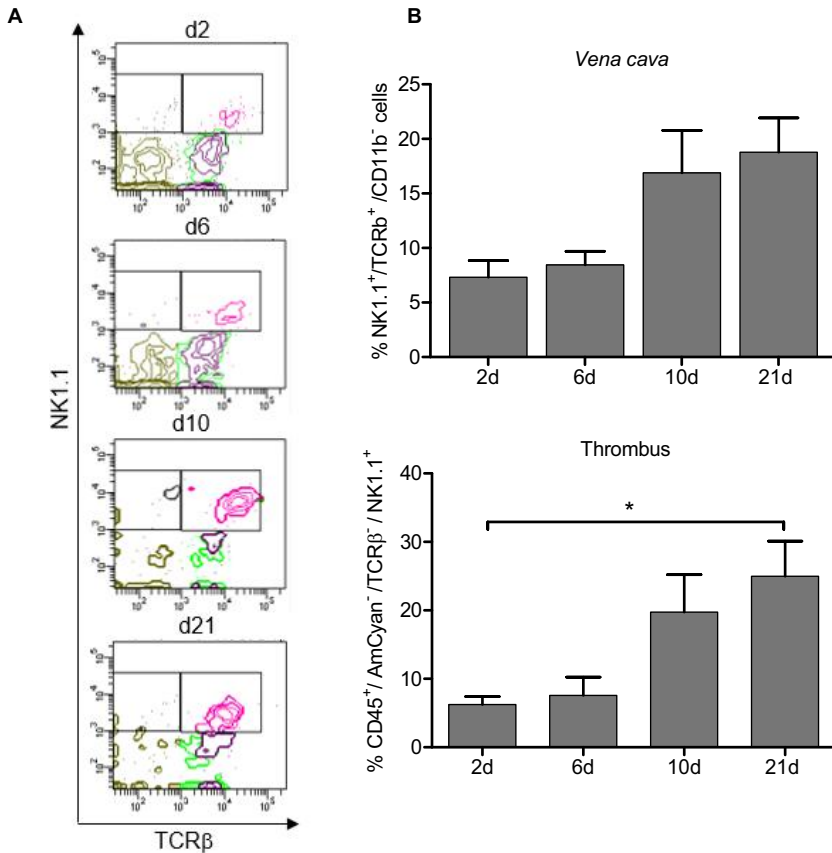


Abbildung 31: Durchflusszytometrisch bestimmter prozentualer Anteil an NK1.1/TCR beta positiven NKT-Zellen in der Vena cava caudalis und im Thrombengewebe.

Durchflusszytometrisch ermittelte prozentuale Veränderung der Anzahl der TCR beta und CD4 positiver Zellen im zeitlichen Verlauf (Tage (d) 2, 6, 10 und 21) ermittelt im Thrombenmaterial und Venensegment und bezogen auf die Population der TCR beta positiver Zellen. **(A)** Repräsentative FACS-Plots; Anteil an NK1.1/TCR beta positiven NKT-Zellen (rosa) im Thrombengewebe **(B)** Zusammenfassende grafische Darstellung der ermittelten Daten an NK1.1/TCR beta positiven NKT-Zellen. (Mittelwerte ± SEM, one way-ANOVA/Bonferroni's Multiple Comparison Test, n=5; * p ≤ 0,05)

Sie teilen sich demnach verschiedene Charaktereigenschaft mit T-Lymphozyten als auch NK-Zellen. Im Venengewebe konnte für den zeitlichen Verlauf folgende Werte ermittelt werden: $7,3 \pm 1,5$ % (Tag 2), $8,5 \pm 1,3$ % (Tag 6), $16,9 \pm 3,9$ % (Tag 10) und $18,8 \pm 3,1$ % (Tag 21). Im Vergleich dazu wurden für das Thrombengewebe Werte von $6,3 \pm 1,2$ % an Tag 2, $7,6 \pm 2,7$ % an Tag 6, $19,8 \pm 5,5$ % an Tag 10 und $25 \pm 5,1$ % an Tag 21 bestimmt. In beiden Geweben zeigte sich eine deutliche Zunahme an NK1.1/TCR beta positiven Zellen (Abb. 31). Diese Zellen stellen eine mögliche Quelle von $\text{Ifn}\gamma$ dar, da vor allem zu späten Zeitpunkten der prozentuale Anteil anstieg.

3.2.4 Natürliche Killerzellen

Da $\text{Ifn}\gamma$ eine wichtige Rolle im Auflösungsprozess eines Thrombus spielt, war es von Interesse auch andere Zellpopulationen zu betrachten, die $\text{Ifn}\gamma$ produzieren. Neben $\text{T}_\text{H}1$ Zellen kommen auch andere Leukozyten, wie zum Beispiel natürliche Killerzellen (NK-Zellen), als Quelle für $\text{Ifn}\gamma$ in Betracht. Der prozentuale Anteil an NK-Zellen bestimmt als NK1.1 positive Population lag im Thrombenmaterial und im Venensegment unter 2 % und machte damit den geringsten Anteil an den insgesamt in dieser Arbeit analysierten Zellpopulationen aus. Die in Abbildung 31 A gezeigten FACS-Plots zeigen im linken „gate“ den ermittelten Anteil an NK 1.1 positiven/TCR beta negativen Zellen. Bis Tag 21 kam es in beiden Geweben zu einem leichten Anstieg dieser Zellen (Abb. 32). Ein Beitrag dieser Population zur $\text{Ifn}\gamma$ Produktion könnte fraglich sein.

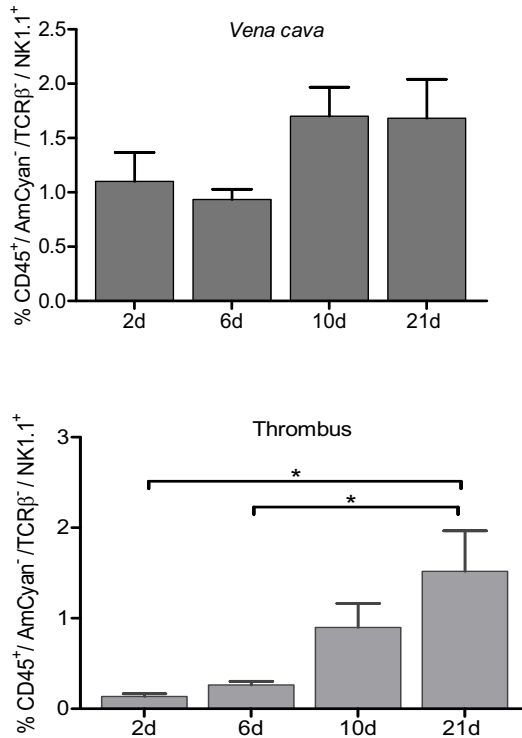


Abbildung 32: Durchflusszytometrisch bestimmter prozentualer Anteil an NK-Zellen in der *Vena cava caudalis* und im Thrombengewebe.

Durchflusszytometrisch ermittelte prozentuale Zunahme an CD45 positiven sowie TCR beta negativen und NK1.1 positiven Zellen im zeitlichen Verlauf (Tag (d) 2, 6, 10, 21), ermittelt im Thrombenmaterial und Venensegment. Zusammenfassende grafische Darstellung der ermittelten Daten an NK 1.1 positiven Zellen (Mittelwerte \pm SEM, one way-ANOVA/Bonferroni's Multiple Comparison Test, n=5; * $p \leq 0,05$). Ein zeitabhängiger prozentualer Anstieg ist darstellbar.

4. Bedeutung immunkompetenter Zellen für die Entstehung und Auflösung venöser Thromben: Modellsystem der LysMCre-iDTR Maus

Die bisher in der Fachliteratur veröffentlichten Daten^{3, 126, 155} deuten auf eine nicht unerhebliche Bedeutung von Monozyten/Makrophagen für die zellulären und molekularen Prozesse im Rahmen der Entstehung bzw. Auflösung von Thromben im venösen Blutgefäßsystem hin. Untersuchungen am Modell der LysMCre-iDTR Maus sollten es ermöglichen, neben der potentiellen Beteiligung der genannten monozytären Zellen auch eine bis *dato* unbekannte Rolle für T-Lymphozyten^{59, 61} an den genannten Vorgängen zu analysieren.

4.1 Depletion monozytärer, immunkompetenter Zellen im Modell der LysMCre-iDTR Maus

Durch Verwendung der LysMCre-iDTR Maus war es möglich, eine spezifische Depletion Lysozym M positiver Zellen, zu denen sowohl Monozyten als auch Granulozyten zählen, hervorzurufen. Die Expression des Diphterietoxinrezeptors (DTR) auf Lysozym M positiven Zellen führte bei intraperitonealer Applikation von Diphterietoxin (DTX) zur Apoptose der DTR exprimierenden Zellen. Auf Grund einer unterschiedlichen Erneuerungsrate wurden Granulozyten weit weniger beeinflusst als Monozyten. Somit erlaubte es das Modell der LysMCre-iDTR Maus Untersuchungen im Organismus mit veringelter Monozytenzahl durchzuführen.

Ein allgemein etabliertes Regime^{47, 159}, welches sich durch eine intraperitoneale DTX-Gabe in einer hohen Dosis (25 ng/g KG) an drei aufeinanderfolgenden Tagen und einer daraufhin fortgesetzten niedrigeren Dosis (5 ng/g KG) für weitere sieben Tage auszeichnete, wurde für die Versuche im Rahmen dieser Arbeit verwendet. Für die jeweilige Fragestellung wurden die Operations- und Entnahmezeitpunkte diesem Regime angepasst. Im Prozess der Thrombenentstehung fand die Ligatur der *Vena cava caudalis* an Tag 9 des insgesamt zehntägigen Depletionsregimes statt (Abb. 7_A), um eine adäquate Verringerung der monozytären Zellen zu erreichen. Nach 48 Stunden wurden die Gewebe für weitere Untersuchungen entnommen. Der Auflösungsprozess eines venösen Thrombus im Modell der LysMCre-iDTR Maus sollte über einen Zeitraum von 14 Tagen mittels Ultraschallanalyse beobachtet werden. Da die zehntägige Gabe von Diphterietoxin den Allgemeinzustand der Tiere beeinflusst, wurde die Ligatur der *Vena cava caudalis* bereits am dritten Tag der

Diphtherietoxingabe durchgeführt. Nachfolgend fand in den anschließenden 14 Tagen (Tag 1, 6, 10 und 14) eine auf Ultraschalluntersuchungen basierte Messung der Thrombenfläche, -breite und -länge statt (Abb. 7 B_2). Um Entstehungsunterschiede der venösen Thromben im Rahmen der Auflösungsstudie weiter zu definieren, wurde Gewebematerial auch schon nach 48 Stunden für weitere Analysen gewonnen (siehe Abbildung 7 B_1).

Für die jeweiligen Regime wurden Thrombengewichte sowie -länge und -breite nach Isolation der Gewebe aufgezeichnet. Um die im Blut, Venen- und Thrombengewebe vorhandenen Zellenpopulationen zu detektieren, erfolgte der durchflusszytometrische Nachweis der Oberflächenexpression von CD45, CD11b, Ly6C, Gr1 und TCR beta. Eine Abgrenzung von Monozyten/Makrophagen zu Granulozyten wurde durch die Kombination der Oberflächenmarkierung für Ly6C, Gr1 und CD11b gewährleistet⁴⁶.

4.2 Einfluss einer Reduktion an monozytären Zellen auf die Thrombenentstehung im *Vena cava caudalis* Stenose Modell

Durch die Ausnutzung des zehntägigen Depletionsregimes mit Diphtherietoxin (Abb. 7_A) konnte eine signifikante Reduktion monozytärer Zellen in allen untersuchten Medien (Blut, Venengewebe und Thrombenmaterial) gezeigt werden. Vor allem in Blutproben erwies sich der prozentuale Anteil CD45 positiver, Ly6C verarmter Monozyten (als Ly6C^{low} bezeichnet) bei den LysMCre-iDTR Mäusen mit Werten von $1,4 \pm 0,3$ % gegenüber dem der LysMCre Kontrollmäusen mit Werten von $4,3 \pm 0,6$ % als signifikant reduziert (Abb. 33). Der prozentuale Anteil an neutrophilen Granulozyten dagegen, bestimmt als Gr1 positive Population, zeigte deutliche Unterschiede. So wiesen die behandelten LysMCre-iDTR Tiere zum Zeitpunkt der Blutentnahme einen deutlich höheren prozentualen Anteil an neutrophilen Granulozyten ($57,8 \pm 7,1\%$) im heparinisierten Blut auf als die als Kontrolle dienende LysMCre Gruppe ($23,4 \pm 3,8$ %) (Abb. 33).

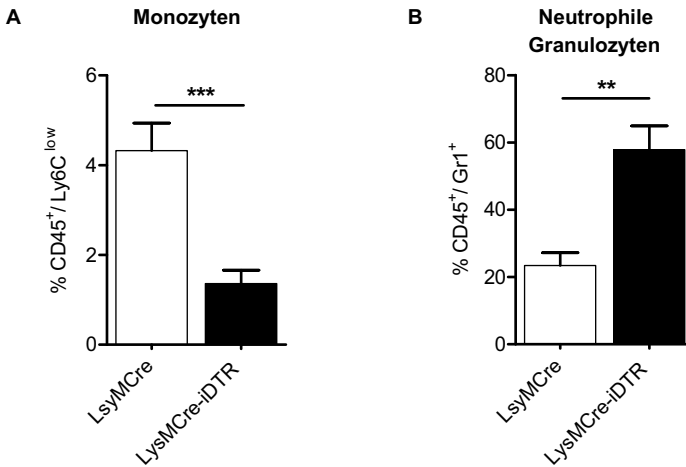


Abbildung 33: Durchflusszytometrie immunologisch markierter Monozyten/neutrophiler Granulozyten in Blutproben entnommen für das Regime der Thrombusentstehung gemäß Abb. 7_A im Modell der LysMCre-iDTR Maus.

Durchflusszytometrisch ermittelte prozentuale Veränderung an CD45 positiven Ly6C^{low} Monozyten sowie CD45 und Gr1 positiven neutrophilen Granulozyten in Vollblutproben von LysMCre und LysMCre-iDTR Mäusen. **(A)** Prozentualer Anteil an CD45 positiven/Ly6C^{low} Monozyten. (Mittelwerte \pm SEM; t-Test; n= 6-8; *** p \leq 0,001). **(B)** Prozentualer Anteil an CD45 positiven/Gr1 positiven neutrophilen Granulozyten. (Mittelwerte \pm SEM; t-Test; n= 6-8; ** p \leq 0,01).

Im Vergleich zu den analysierten Blutproben zeigte sich der durchflusszytometrisch bestimmte prozentuale Anteil an CD11b positiven/Gr1 negativen Monozyten im Venengewebe mit Werten von $9,7 \pm 2,7$ % in der LysMCre-iDTR Gruppe im Gegensatz zur LysMCre Gruppe mit $20,2 \pm 1,8$ % ebenfalls als signifikant reduziert (Abb. 34). Die DTX-induzierte Depletion nahm im Venengewebe keinen Einfluss auf den prozentualen Anteil der dort vorhandenen CD11b positiven/Gr1 positiven neutrophilen Granulozyten. Ihre Analyse ergab Werte von $40,6 \pm 8,0$ % für die Kontrollgruppe und $41,0 \pm 12,4$ % für die LysMCre-iDTR Gruppe. Ein Einfluss konnte andererseits auf die im Venengewebe vorhandene CD45 positive/TCR beta positive T-Zellpopulation gezeigt werden, mit deutlich erhöhten Werten von $9,4 \pm 1,8$ % in den LysMCre-iDTR Mäusen im Gegensatz zu den LysMCre Kontrollmäusen mit Werten von $4,1 \pm 1,2$ % (Abb. 34).

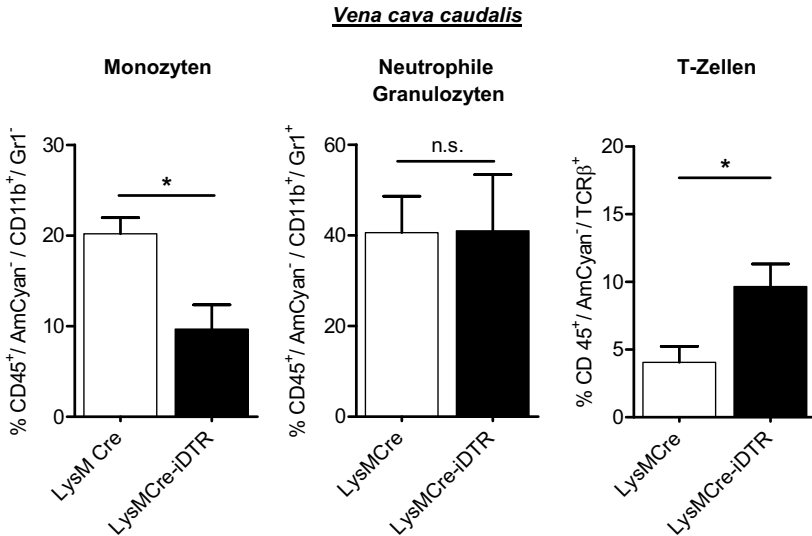


Abbildung 34: Durchflusszytometrisch bestimmte zelluläre Infiltration des Venensegmentes für das Regime der Thrombusentstehung gemäß Abb. 7_A im Modell der LysMCre-iDTR Maus.

Durchflusszytometrisch ermittelte prozentuale Veränderung an CD45 sowie CD11b positiven/Gr1 negativen Monozyten, an CD 45 sowie CD11b und Gr1 positiven neutrophilen Granulozyten und an CD 45 positiven/TCR beta positiven T-Zellen im direkten Vergleich zwischen LysMCre Kontrollmäusen und LysMCre-iDTR Mäusen. Im Gegensatz zu den analysierten Blutproben wurde für den Nachweis der Monozytenpopulation kein Ly6C-Antikörper verwendet (Mittelwerte \pm SEM, Monozyten/neutrophile Granulozyten (normalverteilt): t-Test, n=5; T-Zellen (nicht normalverteilt): Mann-Whitney-Test, n=5, * $p \leq 0,05$).

Auch im Thrombengewebe konnte eine signifikante Verminderung an CD11b positiven/Gr1 negativen Monozyten detektiert werden. Die durchflusszytometrische Analyse resultierte in Werten von $3,8 \pm 0,7$ % an Monozyten für die LysMCre-iDTR Gruppe und $7,4 \pm 1,6$ % für die LysMCre Gruppe. Verglichen mit dem durchflusszytometrisch untersuchten Venengewebe zeigte die Zusammensetzung an CD11b/Gr1 positiven neutrophilen Granulozyten (LysMCre: $71,3 \pm 6$ %/ LysMCre-iDTR: 84 ± 8 %) und an CD 45/ TCR beta positiven T-Zellen (LysMCre: $7,1 \pm 3,9$ %/ LysMCre-iDTR: $6 \pm 1,4$ %) im Thrombengewebe keinerlei Unterschiede (Abb. 35).

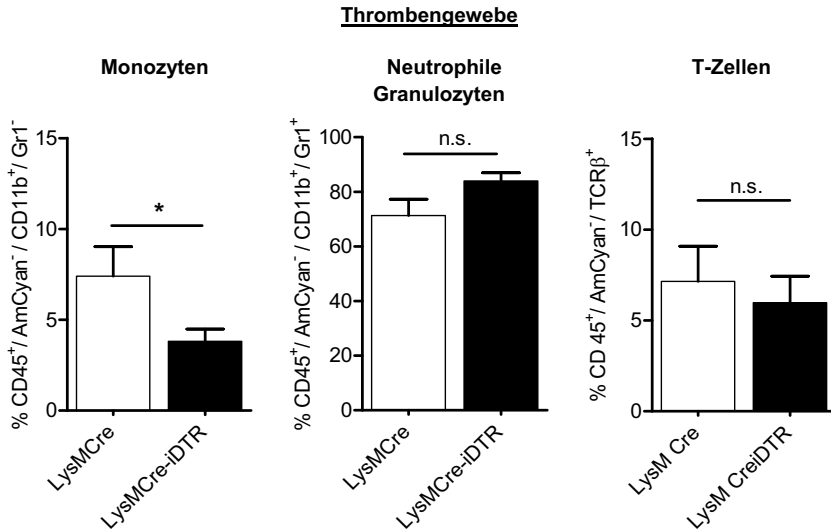


Abbildung 35: Durchflusszytometrisch bestimmte zelluläre Infiltration des Thrombengewebes für das Regime der Thrombusentstehung gemäß Abb. 7_A im Modell der LysMCre-iDTR Maus.

Durchflusszytometrisch ermittelte prozentuale Veränderung an CD45 sowie CD11b positiven/Gr1 negativen Monozyten, an CD 45 sowie CD11b und Gr1 positiven neutrophilen Granulozyten und an CD 45 positiven/TCR beta positiven T-Zellen im direkten Vergleich zwischen LysMCre Kontrollmäusen und LysMCre-iDTR Mäusen. Im Gegensatz zu den analysierten Blutproben wurde hier für die Monozytenpopulation kein Ly6C-Antikörper verwendet (Mittelwerte \pm SEM; t-Test; n=5-7; * p \leq 0,05).

Die Untersuchungen der Gewebe (Blut, Vene, Thrombus) ergaben eine wesentliche Reduktion an monozytären Zellen. Analysen zum Entstehungsprozess venöser Thromben in der *Vena cava caudalis* im Modell der LysMCre-iDTR Maus fanden demnach in einer an Monozyten verarmten Umgebung statt. Der Vergleich der gewonnenen Daten zum Thrombengewebe für deren Länge und Gewicht wurden für beide Gruppen gegenübergestellt und in einem Punktediagramm grafisch ausgewertet. Abbildung 36 zeigt die nach 48 Stunden isolierten Thrombenlängen und -gewichte im Vergleich zwischen LysMCre und LysMCre-iDTR Gruppe. Allgemein zeigte sich innerhalb beider Gruppen eine gewisse Varianz in Gewicht und Länge; der Vergleich beider Gruppen ergab jedoch keine signifikanten Unterschiede. Demzufolge scheint eine Reduktion der monozytären Zellen im Blut, Venen- und Thrombengewebe der LysMCre-iDTR Maus nach einem zehntägigen

Depletionsregime keinen Einfluss auf den Entstehungsprozess einer venösen Thrombose im Stenose Modell der *Vena cava caudalis* zu besitzen.

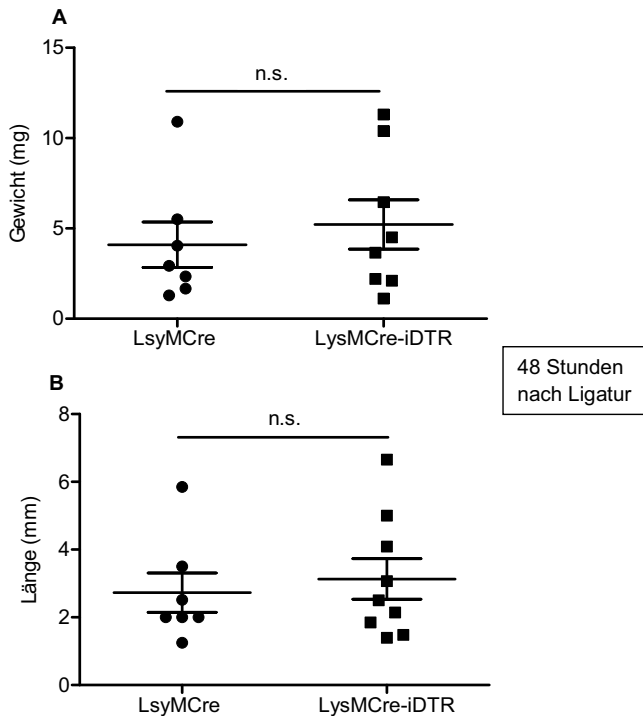


Abbildung 36: Thrombengewicht und Thrombenlänge für das Regime der Thrombusentstehung gemäß Abb. 7_A im Modell der LysMCre-iDTR Maus.

Vergleich von Gewicht und Länge isolierter Thromben aus LysMCre und LysMCre-iDTR Mäusen nach zehntägigem Depletionsregime zur Analyse des Einflusses einer reduzierten Monozytenzahl im Entstehungsprozess einer venösen Thrombose im Modell der LysMCre-iDTR Maus. **(A)** Vergleichende Darstellung der Gewichte (mg) von LysMCre und LysMCre-iDTR Mäusen, **(B)** und der Thrombenlänge nach Extraktion der Thromben (mm) (Mittelwerte \pm SEM; t-Test; n=7-8; n.s. = nicht signifikant). Die Symbole in den Graphen repräsentieren einzelne Versuchstiere.

4.3 Einfluss einer Reduktion an monozytären Zellen auf die Thrombenauflösung im *Vena cava caudalis* Stenose Modell

Im nächsten Teil dieser Arbeit sollte mit Hilfe der LysMCre-iDTR-Maus der Auflösungsprozess des gebildeten Thrombus bei einer Depletion monozytärer Zellen, unter Verwendung der Ultraschalluntersuchung und FACS-Analyse, näher betrachtet werden. Hierfür wurde eine Longitudinalstudie an jeweils acht Tieren pro Gruppe durchgeführt (Abb. 7 B_2). Um die Auswirkungen der Monozytendepletion im Auflösungsprozess des Thrombus zu untersuchen, erfolgte die Venenligatur bereits am dritten Tag des insgesamt zehntägigen Depletionsregimes.

Die innerhalb diesen Kapitels gezeigte bessere Auflösung von thrombotischen Material in der LysMCre-iDTR Gruppe wurde von einer unterschiedlichen Stimulation im Entstehungsprozess begleitet (Abb. 37). Eine Isolation des Thrombenmaterials innerhalb der Auflösungsstudie 48 Stunden nach Durchführung der Venenligatur zeigte deutlich signifikante Unterschiede in Länge und Gewicht der venösen Thromben (Abb. 37). Verglichen mit der Kontrollgruppe (Thrombengewicht: $7,5 \pm 1,9$ mg/ -länge: $3,8 \pm 0,7$ mm) stellten sich die isolierten Thromben der LysMCre-iDTR (Thrombengewicht: $25,6 \pm 3,6$ mg/ -länge: $9,3 \pm 0,6$ mm) Tiere als signifikant länger ($p \leq 0,01$) und schwerer ($p \leq 0,001$) dar.

Im Rahmen der Auflösungsstudie wurden die Tiere über insgesamt 10 Tage mit Diphterietoxin behandelt; am dritten Tag der DTX-Gabe erfolgte die Venenligatur eine auf Ultraschalluntersuchungen basierte Analyse wurde an Tag 1, 6, 10 und 14 nach dem Eingriff durchgeführt. Die Darstellung erfolgte in der langen Achse zur Bestimmung der Größe, Breite sowie Gesamtfläche des dargestellten Thrombus. Es wurde darauf geachtet, den Thrombus in seiner größtmöglichen Darstellung zu vermessen, um vergleichbare Daten zu erhalten. Abbildung 38 zeigt exemplarisch die unterschiedliche Größenabnahme eines venösen Thrombus, dargestellt mit Hilfe des B-Modes in der langen Achse einer LysMCre-iDTR-Maus im Vergleich zur Kontrollmaus, untersucht zu den vier verschiedenen Zeitpunkten.

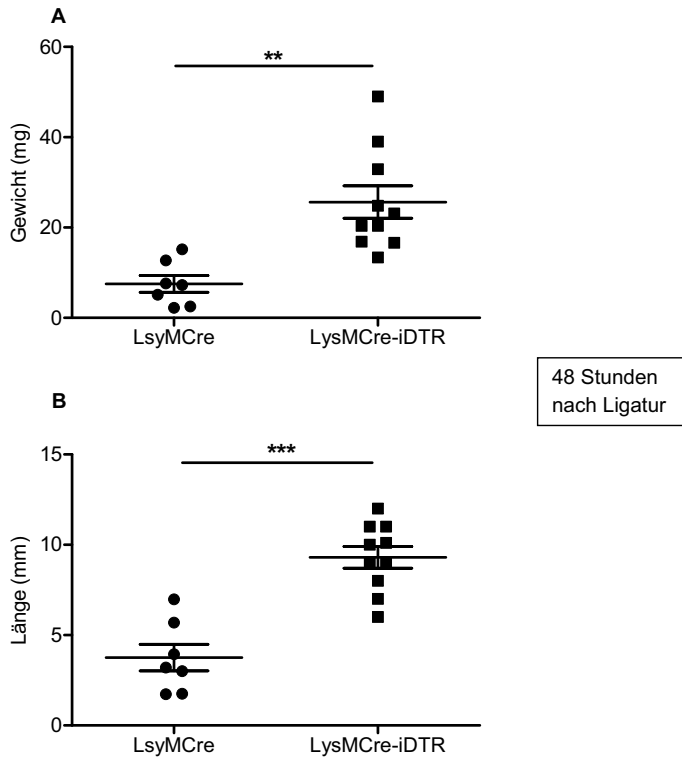


Abbildung 37: Thrombengewicht und Thrombenlänge für das Regime der Thrombenauflösung gemäß Abb. 7_B1 im Modell der LysMCre-iDTR Maus.

Vergleich von Gewicht und Länge isolierter Thromben aus LysMCre und LysMCre-iDTR Mäusen innerhalb der Auflösungsstudie zur Analyse des Einflusses einer reduzierten Monozytenanzahl im Auflösungsprozess einer venösen Thrombose im Modell der LysMCre-iDTR Maus. **(A)** Vergleichende Darstellung der Gewichte (mg) von LysMCre und LysMCre-iDTR Mäusen und der **(B)** Thrombenlänge nach Extraktion der Thromben in mm (Mittelwerte \pm SEM; t-Test; $n=7-11$; ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$). Die Symbole in den Graphen repräsentieren einzelne Versuchstiere.

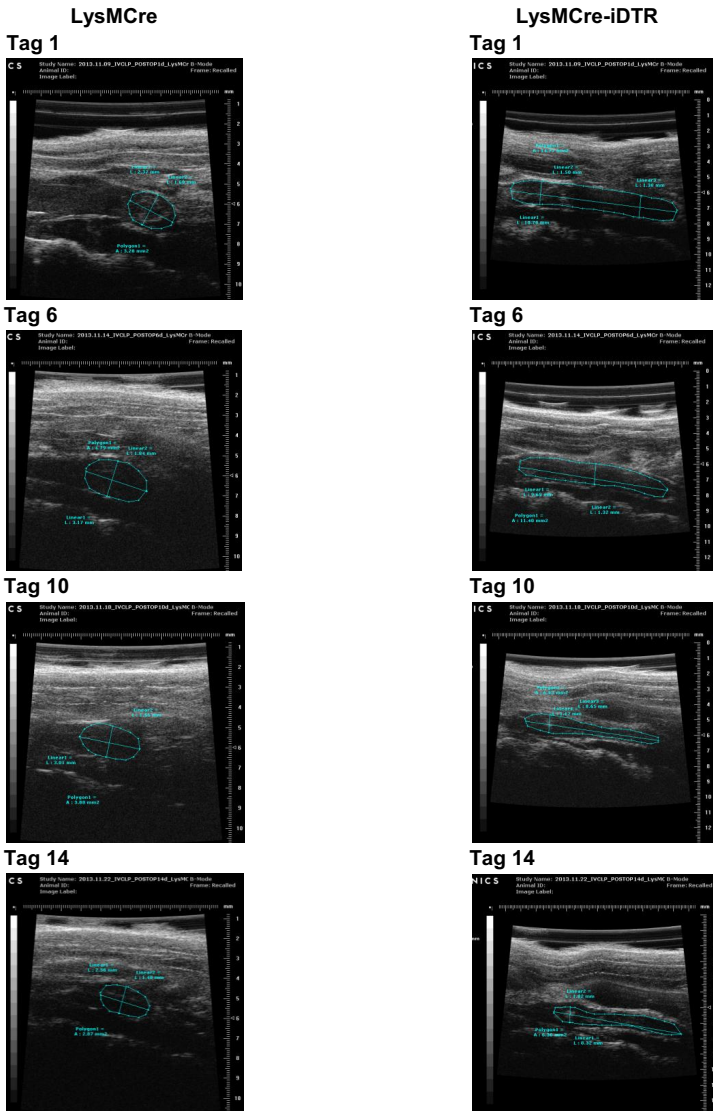


Abbildung 38: Repräsentative B-Mode Darstellung der zeitabhängigen Auflösung eines Thrombus in der Vena cava caudalis für das Regime der Thrombusauflösung gemäß Abb. 7_B2 im Modell der LysMCre-iDTR Maus.

Ultraschallbilder der in der langen Achse dargestellten und vermessenen venösen Thromben von behandelten LysMCre-iDTR-Mäusen sowie LysMCre Kontrollmäusen. Die Darstellung der LysMCre-iDTR Thromben erfolgte um ca. 20% verkleinert aufgrund der Länge des Thrombus.

Die Kalkulation der Flächenabnahme erfolgte basierend auf der gemessenen Thrombenfläche an Tag 1 nach Ligatur der *Vena cava caudalis* und wurde individuell für jedes Tier ermittelt. Die absolut bestimmten Flächen, sowie die prozentuale Abnahme der Fläche wurde grafisch dargestellt (Abb. 39).

Anhand der visuellen Beurteilung der in Abbildung 38 dargestellten Ultraschallbilder ließen sich bereits vor der endgültigen Auswertung zwei Aussagen treffen. Demnach zeigte die LysMCre-iDTR Maus einen deutlich größeren Thrombus in der *Vena cava caudalis* und zudem war die Auflösung über den 14-tägigen Beobachtungszeitraum beschleunigt, verglichen mit den Kontrollen (LysMCre). Der Ausgangszeitpunkt an Tag 1 wurde bei beiden Gruppen auf 100 % gesetzt, für Tag 6 (LysMCre: 114 ± 10 %/ LysMCre-iDTR: $92 \pm 3,2$ %) ergab sich ein signifikant reduzierter Wert mit $p \leq 0,05$ und für Tag 10 (LysMCre: $98 \pm 4,3$ %/ LysMCre-iDTR: 70 ± 6 %) ebenfalls, mit $p \leq 0,01$ (Abb. 39_B). Die Mittelwerte für Tag 14 mit $71,3 \pm 6,3$ % in der LysMCre Gruppe und $54,4 \pm 6,2$ % in der LysMCre-iDTR Gruppe erwiesen sich als nicht signifikant voneinander unterschiedlich. Eine Gegenüberstellung der absoluten Flächen ergab aufgrund der Varianzen keine signifikanten Unterschiede (Abb. 39_A). Es ergaben sich dabei Werte von $10,1 \pm 1,5 \text{ mm}^2$ (Tag 1), $9,6 \pm 1,3 \text{ mm}^2$ (Tag 6), $6,3 \pm 1,1 \text{ mm}^2$ (Tag 10) und $5,5 \pm 1,0 \text{ mm}^2$ (Tag 14) für die LysMCre-iDTR Gruppe. Für die LysMCre Gruppe wurden Werte von $6,2 \pm 1,4 \text{ mm}^2$ (Tag 1), $6,8 \pm 0,9 \text{ mm}^2$ (Tag 2), $5,7 \pm 1,1 \text{ mm}^2$ (Tag 10) und $4,3 \pm 0,9 \text{ mm}^2$ (Tag 14) ermittelt (Abb. 39_A). Die prozentuale Abnahme der Thrombenfläche stellte sich in der LysMCre-iDTR Gruppe an Tag 6 und 10 deutlich verbessert dar, was auf einen allgemein schnelleren Auflösungsprozess bei diesen Tieren hindeutete (Abb. 39_B).

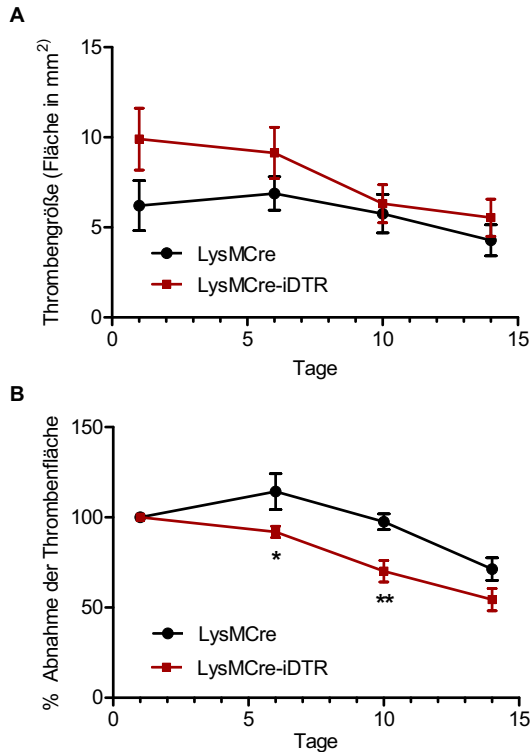


Abbildung 39: Auf Ultraschalluntersuchungen (B-Mode) basierende quantitative Analyse der Auflösung eines Thrombus in der Vena cava caudalis gemäß Regime Abb. 7_B2 im Modell der LysMCre-iDTR Maus.

(A) Grafische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der absolut gemessenen Flächen venöser Thromben in LysMCre und LysMCre-iDTR Mäusen (B) Prozentuale Abnahme der mittels Ultraschallanalyse in der langen Achse bestimmten Thrombenflächen, Kalkulation basierend auf der Gesamtfläche gemessen an Tag 1. Signifikanzen bestehend an Tag 6 und Tag 10 in der LysMCre-iDTR Gruppe. (Mittelwerte \pm SEM; two-way ANOVA/Bonferroni post test; $n=8$; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$). Signifikant bessere Auflösung bestehend an Tagen 6 und 10 in der LysMCre-iDTR Gruppe verglichen mit der LysMCre Kontrollgruppe.

Da die Ligatur der *Vena cava caudalis* in der Auflösungsstudie zu einem früheren Zeitpunkt im insgesamt zehntägigen Depletionsregime durchgeführt wurde, sollten zusätzlich zum Extraktionszeitpunkt der Thromben Vollblutproben eine Erfassung des prozentualen Anteils an Monozyten und neutrophilen Granulozyten geben.

Durchflusszytometrisch wurde ein signifikant verringerter Anteil CD45 positiver, Ly6C verarmter Monozyten von $2,4 \pm 0,4$ % für die LysMCre-iDTR Tiere im Gegensatz zu Werten von $7,0 \pm 0,9$ % für die LysMCre Kontrollmäuse bestimmt. Der prozentuale Anteil an neutrophilen Granulozyten stellte sich wie auch schon in Kap. 4.2 für die LysMCre-iDTR Gruppe als deutlich erhöht mit $61,2 \pm 2,4$ % im direkten Vergleich zu $34,0 \pm 4,2$ % für die LysMCre Gruppe dar (Abb. 40). Anhand dieser Daten kann auch schon zu einem früheren Zeitpunkt im Depletionsregime von einer signifikanten Reduktion an monozytären Zellen im Vollblut ausgegangen werden.

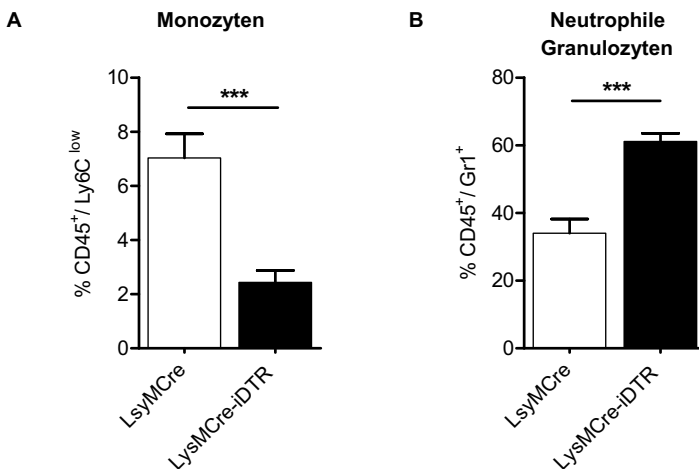


Abbildung 40: Durchflusszytometrie immunologisch markierter Monozyten/neutrophiler Granulozyten in Blutproben entnommen für das Regime der Thrombusentstehung gemäß Abb. 7 B_1 im Modell der LysMCre-iDTR Maus.

Durchflusszytometrisch ermittelte prozentuale Veränderung an CD45 positiven, Ly6C verarmten (Ly6C^{low}) Monozyten sowie CD45 und Gr1 positiven neutrophilen Granulozyten in Vollblutproben von LysMCre und LysMCre-iDTR Mäusen 48 Stunden nach Ligatur der *Vena cava caudalis*. **(A)** Prozentualer Anteil an CD45 positiven/ Ly6C^{low} Monozyten. (Mittelwerte ± SEM; t-Test; n= 10; *** p ≤ 0,001). **(B)** Prozentualer Anteil an CD45 positiven/Gr1 positiven neutrophilen Granulozyten. (Mittelwerte ± SEM; t-Test; n= 10; *** p ≤ 0,001).

4.4 Veränderungen der Infiltration inflammatorischer Zellen und veränderte mRNA-Expressionswerte beeinflussen die Auflösung venöser Thromben im Modell der LysMCre-iDTR Maus

Die durchflusszytometrische Analyse der zellulären Zusammensetzung der im Kontrast zur LysMCre Kontrollgruppe stark vergrößerten Thromben im *Vena cava* Modell der LysMCre-iDTR Maus könnte Hinweise auf eine mögliche Stimulation zur Thrombenentstehung geben.

Im Gegensatz zu den analysierten Blutproben zeigte der durchflusszytometrisch bestimmte prozentuale Anteil an CD11b positiven/Gr1 negativen Monozyten im Venengewebe mit Werten von $11,8 \pm 0,5$ % in der LysMCre-iDTR Gruppe zur LysMCre Gruppe mit $11,4 \pm 1,0$ % keinerlei Unterschiede (Abb. 41). Die Depletion nahm im Venengewebe jedoch einen Einfluss auf die dort vorhandenen CD11b positiven/Gr1 positiven neutrophilen Granulozyten. Ihre Analyse ergab Werte von $55,1 \pm 4,5$ % für die Kontrollgruppe und einen erhöhten Anteil von $74,5 \pm 2,7$ % für die LysMCre-iDTR Gruppe. Die im Venengewebe vorhandene CD45/TCR beta positive T-Zellpopulation zeigte deutlich verringerte Werte von $13,7 \pm 1,5$ % für die LysMCre-iDTR Mäuse im Gegensatz zu den LysMCre Kontrollmäusen mit Werten von $27,0 \pm 2,2$ % (Abb. 41).

Abweichend zu den vorigen Ergebnissen im Blut und Venengewebe der LysMCre-iDTR Tiere konnte eine starke Erhöhung an CD11b positiven/Gr1 negativen Monozyten im Thrombengewebe detektiert werden. Die durchflusszytometrische Analyse resultierte in Werten von $15,7 \pm 1,4$ % für Monozyten in der LysMCre-iDTR Gruppe und $3,3 \pm 0,8$ % in der LysMCre Gruppe. Im Kontrast zum durchflusszytometrisch untersuchten Venengewebe zeigte die Zusammensetzung an CD11b/Gr1 positiven neutrophilen Granulozyten eine Verringerung dieser Zellen in den LysMCre-iDTR Tieren mit $71,3 \pm 1,4$ % verglichen zu Werten von $84,2 \pm 1,9$ % in der Kontrollgruppe. Der prozentuale Anteil an CD45/ TCR beta positiven T-Zellen im Thrombengewebe wies keine Unterschiede auf (Abb. 42).

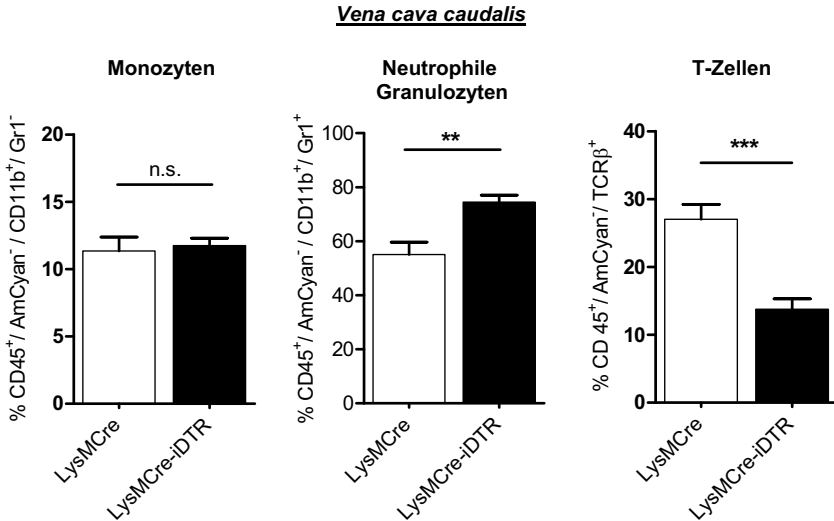


Abbildung 41: Durchflusszytometrisch bestimmte zelluläre Zusammensetzung des Venengewebes aus behandelten LysMCre-iDTR und LysMCre Mäusen innerhalb der Auflösungsstudie 48 Stunden nach Liagtur der Vena cava caudalis gemäß Abb. 7_B1 im Modell der LysMCre-iDTR Maus.

Durchflusszytometrisch ermittelte prozentuale Veränderung an CD45 sowie CD11b positiven/Gr1 negativen Monozyten, an CD 45 sowie CD11b und Gr1 positiven neutrophilen Granulozyten und an CD 45 positiven/TCR beta positiven T-Zellen im direkten Vergleich zwischen LysMCre Kontrollmäusen und LysMCre-iDTR Mäusen. Im Gegensatz zu den analysierten Blutproben wurde hier für die Monozytenpopulation kein Ly6C-Antikörper verwendet (Mittelwerte \pm SEM; t-Test; n=6-7; ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, n.s. = nicht signifikant).

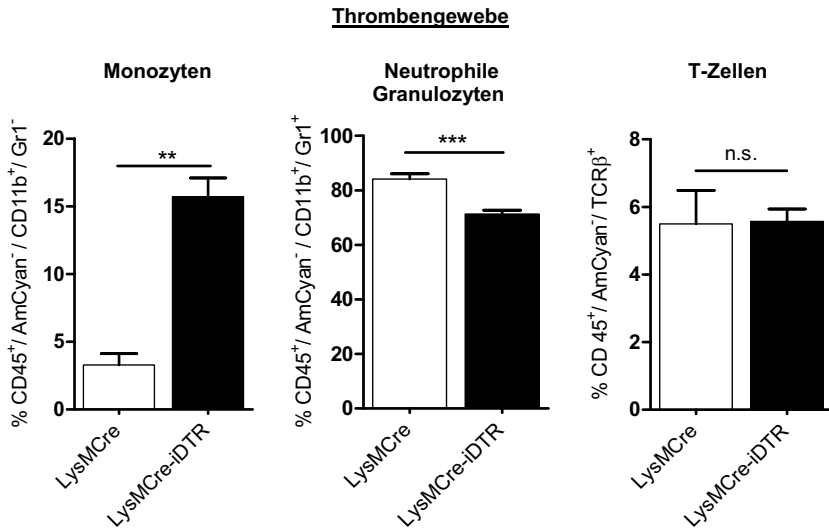


Abbildung 42: Durchflusszytometrisch bestimmte zelluläre Zusammensetzung des Thrombengewebes aus behandelten LysMCre-iDTR und LysMCre Mäusen innerhalb der Auflösungsstudie 48 Stunden nach Liagtur der *Vena cava caudalis* gemäß Abb. 7_B1 im Modell der LysMCre-iDTR Maus.

Durchflusszytometrisch ermittelte prozentuale Veränderung an CD11b, CD45 und Gr1 positiven neutrophilen Granulozyten sowie CD45, CD11b positiven und Gr1 negativen Monozyten und CD45 und TCR beta positiven T-Zellen im direkten Vergleich zwischen LysMCre Kontrollmäusen und LysMCre-iDTR Mäusen im Thrombengewebe. Im Gegensatz zu den analysierten Blutproben wurde hier für die Monozytenpopulation kein Ly6C-Antikörper verwendet (Mittelwerte \pm SEM; t-Test; $n=7$; ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, n.s. = nicht signifikant).

Die Analyse des entnommenen Thrombengewebes mit Hilfe der RT-PCR zur Darstellung von Unterschieden in der Makrophagen spezifischen mRNA Expression von Chemo- und Zytokinen ergab signifikante Unterschiede für das Chemokin CCL2 (auch als MCP-1 bezeichnet), für Thromboplastin (TF) und IL4. Folgende Werte wurden für das Thrombengewebe der LysMCre-iDTR Maus ermittelt; $362,9 \pm 86,1\%$ für CCL2, $343,4 \pm 63\%$ für TF und $759 \pm 254,2\%$ für IL4 (Abb. 43). Diese Ergebnisse sprechen vor allem für das vermehrte Auftreten von aktivierten Monozyten im Thrombengewebe und könnten für eine mögliche Begründung zur besseren Auflösung der venösen Thromben herangezogen werden.

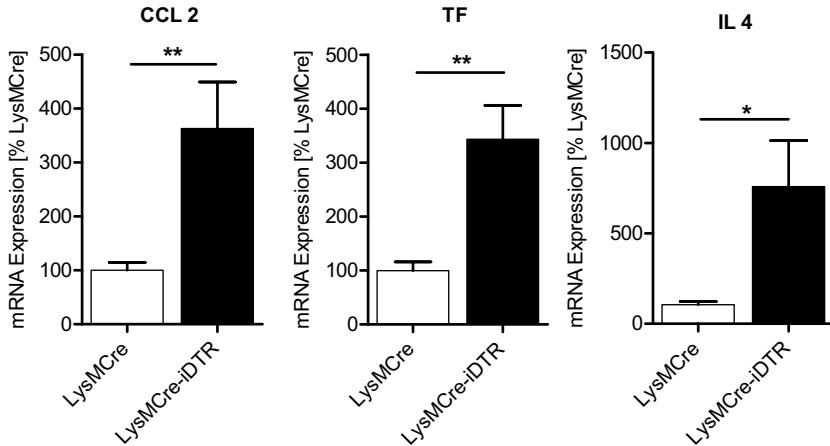


Abbildung 43: RT-PCR Analyse zur mRNA Expression von CCL 2, TF und IL4 im Thrombengewebe der behandelten LysMCre-iDTR und LysMCre Mäuse im Rahmen der Auflösungsstudie 48 Stunden nach Liagtur der *Vena cava caudalis* gemäß Abb. 7_B1 im Modell der LysMCre-iDTR Maus.

Quantitative RT-PCR Analyse der mRNAs für CCL2 (MCP1), Thromboplastin (TF) und Interleukin 4 (IL4) aus Thrombengewebe behandelter LysMCre und LysMCre-iDTR Mäuse. Als Haushaltsgen wurde beta Aktin verwendet. Es wurden stets Doppelbestimmungen durchgeführt und die Expression der Kontrollgruppe auf 100% gesetzt (Mittelwerte \pm SEM; t-Test; n= 5-8; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

4.5 Potentielle Stimulation der Thrombusbildung durch Apoptose der monozytären Zellen der behandelten LysMCre-iDTR Maus

Die Verwendung des Diphterietoxins im Modell der LysMCre-iDTR Maus führt zur Auslösung der Apoptose und somit zum Untergang der Lysozym M exprimierenden Zellen. Ein stimulativer Effekt auf das Endothel des Venengewebes, hervorgerufen durch apoptotische Zellen in der Blutzirkulation, wäre eine mögliche Erklärung für die vergrößerten Thromben der LysMCre-iDTR Mäuse im Rahmen der Auflösungsstudie. Die Untersuchung von Vollblutproben auf den prozentualen Anteil Annexin V positiver/7-AAD negativer apoptotischer Zellen zum Zeitpunkt der durchgeführten Ligatur der *Vena cava caudalis* zeigte signifikant erhöhte Werte für die LysMCre-iDTR Mäuse.

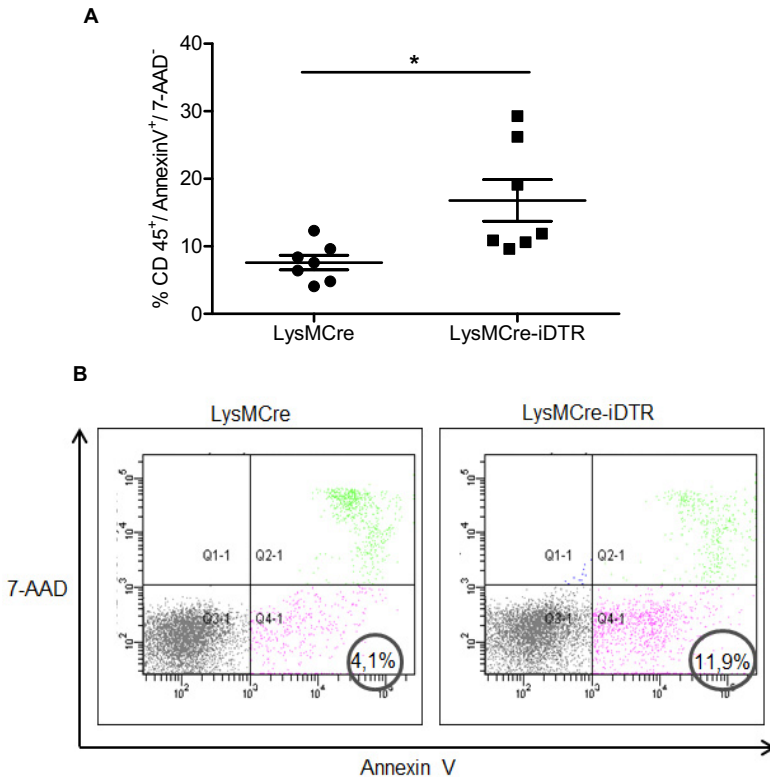


Abbildung 44: Durchflusszytometrie fluoreszenzmarkierter Annexin V positiver/7-AAD negativer apoptotischer Zellen in Blutproben von LysMCre und LysMCre-iDTR Mäusen nach einer dreitägigen Behandlung mit DTX gemäß Abb. 7_B1.

(A) Durchflusszytometrisch ermittelte prozentuale Veränderungen an Annexin V positiven/7-AAD negativen apoptotischen Zellen in Vollblutproben, entnommen zum Zeitpunkt der Ligatur der LysMCre und LysMCre-iDTR Mäuse. (Mittelwerte \pm SEM; t-Test; $n=7$; * $p \leq 0,05$). Die Symbole repräsentieren dabei einzelne Versuchstiere. **(B)** Repräsentative FACS-Plots zeigen eine deutliche Zunahme an CD45 positiven, Annexin V positiven, lebenden Zellen in der Blutprobe der LysMCre-iDTR Maus. Q4-1 bezeichnet die Population der Zellen die für Annexin V positiv aber für 7-AAD negativ sind.

Die LysMCre-iDTR-Gruppe wies einen deutlich höheren Anteil an apoptotischen Zellen in der Zirkulation im Gegensatz zur behandelten Kontrollgruppe auf (Abb. 44_A). Ein möglicher Einfluss auf die Expression verschiedener Zelladhäsionsmoleküle im Venengewebe könnte eine weitere Erklärung zur gesteigerten Thrombusbildung in der LysMCre-iDTR Gruppe bedeuten.

Mikropartikel (apoptotische Körperchen), wie sie im Prozess des programmierten Zelltodes entstehen, können verschiedene Effekte auf das Endothel von Blutgefäßen ausüben⁷⁵ und dadurch die Anlagerung inflammatorischer Zellen begünstigen. Diese Tatsache spricht für ein vermehrtes Auftreten venöser Thromben. In diesem Zusammenhang wurden entnommene Venensegmente nach dreitägiger Diphterietoxin Injektion entnommen (es erfolgte keine Ligatur der *Vena cava caudalis*) und auf die Expression von Thromboplastin (TF), dem vaskulären

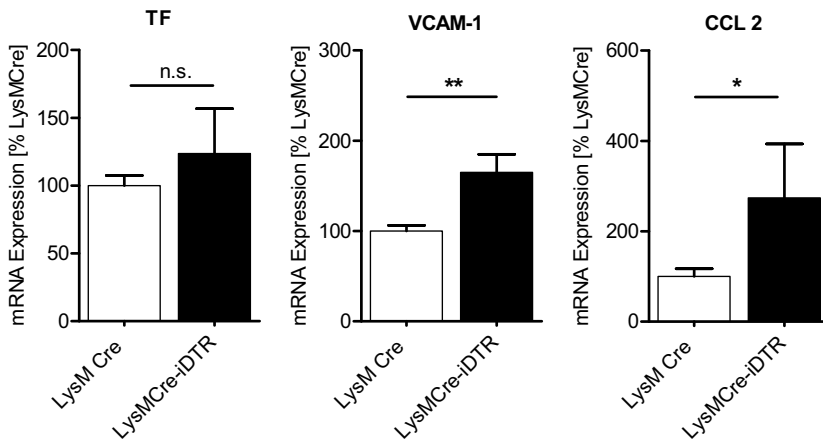


Abbildung 45: RT-PCR Analyse zur mRNA Expression von TF, VCAM und CCL2 im Venengewebe der LysMCre und LysMCre-iDTR Mäuse nach dreitägiger Diphterietoxin Gabe gemäß Abb. 7_B1.

Quantitative RT-PCR Analyse der mRNAs für Thromboplastin (TF), das vaskuläre Zelladhäsionsprotein 1 (VCAM-1) und CCL2 (MCP1) aus Venengewebe (am dritten Tag der DTX Gabe entnommen) behandelter LysMCre und LysMCre-iDTR Mäuse. Als Haushaltsgen wurde das TATA-box bindende Protein (TBP) verwendet. Es wurden stets Doppelbestimmungen durchgeführt und die Expression der Kontrollgruppe auf 100% gesetzt (Mittelwerte \pm SEM; t-Test für VCAM; Mann Whitney Test für TF/ CCL2; n=8; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, n.s. = nicht signifikant).

Zelladhäsionsprotein 1 (VCAM-1) und Monozyten-chemotaktischen Protein 1 (CCL2) und hinsichtlich der mRNA Expression unter anderem von Adhäsionsmolekülen analysiert. Es zeigte sich hierbei keine Veränderung der Expression von TF im Gewebe der LysMCre-iDTR Maus, jedoch war die Expression von VCAM-1 ($161,1 \pm 19,8$ %) und CCL2 (274 ± 120 %) deutlich erhöht in der LysMCre-iDTR Gruppe verglichen zur Kontrollgruppe (Abb. 45).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Depletion monozytärer Zellen im Modell der LysMCre-iDTR Maus keinen Einfluss auf den Entstehungsprozess eines venösen Thrombus im Ligaturmodell der *Vena cava caudalis* nimmt. Hauptsächlich zu Beginn des Depletionsschemas innerhalb der Auflösungsstudie führen die stimulatorischen Effekte auf das Endothel der Gefäßwand, wahrscheinlich hervorgerufen durch das vermehrte Vorkommen apoptotischer Zellen in der Zirkulation, zu einer gesteigerten Bildung venöser Thromben. Eine vermehrte Expression von Zelladhäsionsmolekülen, möglicherweise hervorgerufen durch die Bildung von Mikropartikeln (apoptotischen Körperchen) beim Untergang der Zellen, führte zu signifikant größeren Thromben in der behandelten LysMCre-iDTR Maus. Die erhöhte Expression von VCAM-1 verursacht ein vermehrtes Rollen von leukozytären Zellen am Endothel⁷⁹ und könnte demnach die Thrombusbildung im Allgemeinen gefördert haben. Da die Expression von CCL2 im Venengewebe deutlich erhöht war und dieses besonders chemotaktisch auf Monozyten wirkt, führte dies gegebenenfalls zu einer vermehrten Anhäufung von monozytären Zellen im Bereich der venösen Gefäße. Die verbesserte Auflösung von Thrombenmaterial in der LysMCre-iDTR Gruppe scheint durch den schon zu Beginn erhöhten prozentualen Anteil monozytärer Zellen im Thrombengewebe gefördert zu werden. Eine erhöhte Expression von Interleukin 4 und CCL2 im Thrombengewebe deutet auf ein antiinflammatorisches Geschehen hin und könnte so den Auflösungsprozess positiv beeinflussen.

5. Auswirkung einer Verschiebung zur T_H2 Immunantwort auf den Auflösungsprozess venöser Thromben im Modell der Tbx 21 knockout Maus

Bisherige Daten zeigen einen essentiellen Einfluss von Ifn γ im Prozess der Auflösung von Thromben im venösen System¹¹⁵. Als Signaturzytokin von T_H1-Immunantworten zeigte Ifn γ Einfluss auf die VEGF und TGF beta Expression, was bereits im Bereich der Wundheilung beschrieben wurde⁶⁴. Die Produktion erfolgt außer durch T_H1-Lymphozyten auch durch NK-Zellen und Makrophagen. Da die bisher erzielten durchflusszytometrisch ermittelten Daten von Thromben- und Venengewebe im Rahmen des Auflösungsprozesses bis Tag 21 eine deutliche Zunahme an T-Zellen (Abb. 29) und Monozyten/Makrophagen zeigten, sollte im nächsten Teil dieser Arbeit untersucht werden, wie eine Verschiebung zur T_H2-Immunantwort die Auflösung venöser Thromben im Ligaturmodell der *Vena cava caudalis* beeinflusst.

5.1 Verschiebung zur T_H2 Immunantwort fördert den Auflösungsprozess im chronischen Stadium eines venösen Thrombus

Für die in dieser Arbeit untersuchten Mechanismen zur T_H2 Verschiebung wurde die Tbx 21 knockout (ko) Maus als Modell gewählt. Diese weist einen Defekt in der Entwicklung von T_H1-Lymphozyten auf, welcher zu einer Überproduktion an T_H2 spezifischen Zytokinen führt. Die Produktion von Ifn γ ist bei diesen Tieren stark vermindert^{118, 144}. Ähnlich wie im Modell der LysMCre-iDTR Maus sollte in der Tbx 21 ko Maus der Auflösungsprozess mittels Ultraschalluntersuchung über 21 Tage verfolgt werden. Die Analyse von Thrombenlänge, -breite und -fläche erfolgte hierzu an Tag 2, 6, 10, 14 und 21 nach Ligatur der *Vena cava caudalis*. Um vorab einen Überblick zur Thrombusentstehung zu erhalten wurde zunächst 48 Stunden nach Ligatur der *Vena cava caudalis* Thrombenmaterial extrahiert und ein Vergleich für Thrombengewicht und -länge zwischen C57BL/6 Wildtypmäusen und Tbx 21 ko Mäusen grafisch ausgewertet. Hierbei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Thromben bei Tbx 21 ko und Wildtypmäusen (B6), wie Abbildung 46 zeigt.

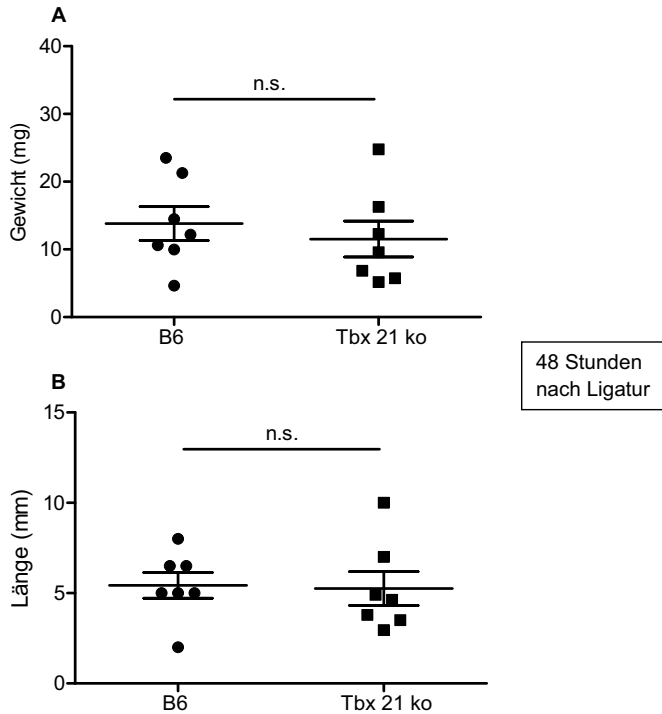


Abbildung 46: Thrombengewicht und Thrombenlänge nach Ligatur der Vena cava caudalis: Kontrollmaus (B6) versus Tbx 21 ko Maus.

Vergleich von Gewicht und Länge isolierter Thromben aus C57BL/6 und Tbx 21 ko Mäusen 48 Stunden nach erfolgter Venenligatur **(A)** Vergleichende Darstellung der Gewichte (mg) von C57BL/6 und Tbx 21 ko Mäusen und der **(B)** Thrombenlänge nach Extraktion der Thromben (mm) (Mittelwerte \pm SEM; t-Test; $n=7-11$; n.s. = nicht signifikant). Die Symbole in den Graphen repräsentieren einzelne Versuchstiere.

Die ultraschallbasierte Longitudinalstudie erfolgte an jeweils sieben Mäusen der Kontrollgruppe (C57BL/6 = B6) sowie der Tbx 21 ko Gruppe. Das Augenmerk lag hierbei vor allem auf dem Vergleich der gemessenen Flächenwerte. Ausgehend von den ermittelten Daten wurde auch hier die prozentuale Abnahme der Thrombenfläche bezogen auf den Ausgangswert an Tag 2 berechnet und grafisch dargestellt (Abb. 48).

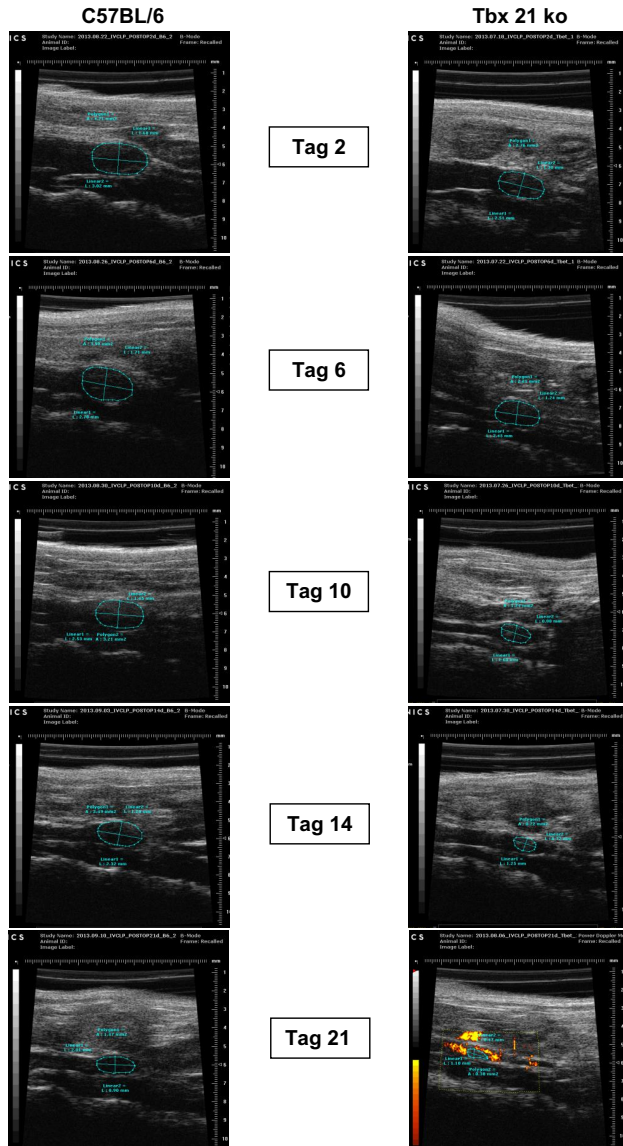


Abbildung 47: Repräsentative B-Mode Darstellung der zeitabhängigen Auflösung eines Thrombus im Vergleich zwischen Kontrolle versus Tbx 21 ko Maus.

Ultraschallbilder der in Längsachse dargestellten und vermessenen venösen Thromben von Kontrollmaus (C57BL/6) und Tbx 21 ko Maus in der Vena cava caudalis.

Die vergleichende Darstellung der absoluten Flächen wies keine Signifikanzen auf (Abb. 48_A). Es ergaben sich Werte von $4,7 \pm 0,5$ % (Tag 2), $5,1 \pm 0,4$ % (Tag 6), $4,8 \pm 0,5$ % (Tag 10), $3,7 \pm 0,4$ % (Tag 14) und $1,9 \pm 0,2$ % (Tag 21) in der Kontrollgruppe und $5,8 \pm 1,0$ (Tag 2), $5,2 \pm 1,0$ % (Tag 6), $4,1 \pm 0,8$ % (Tag 10), $2,2 \pm 0,5$ % (Tag 14) und $0,9 \pm 0,6$ % (Tag 21) für die Tbx 21 ko Gruppe. Bei der Ermittlung der prozentualen Unterschiede wurden signifikant geringere Werte in der Tbx 21 ko Gruppe an Tag 10 (B6: $98,2 \pm 5$ %/Tbx 21 ko: $71,7 \pm 5,4$ %) mit $p \leq 0,001$, Tag 14 (B6: $78,7 \pm 6$ %/Tbx 21 ko: $43,2 \pm 6$ %) mit $p \leq 0,001$ und Tag 21 (B6: $43,2 \pm 6$ %/Tbx 21 ko: $22,7 \pm 4$ %) mit $p \leq 0,05$ deutlich (Abb. 48_B). Eine Verschiebung zur T_H2-Immunantwort scheint demnach die Auflösung eines venösen Thrombus in der *Vena cava caudalis* der Tbx 21 ko Maus positiv zu beeinflussen.

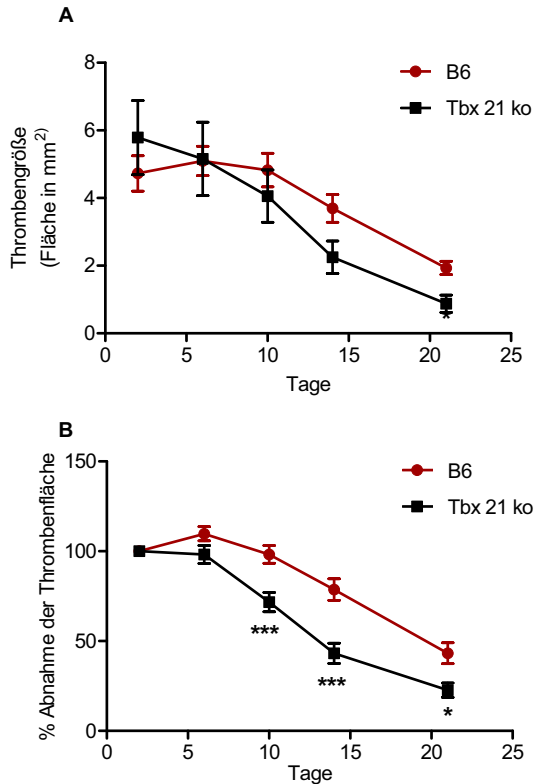


Abbildung 48: Ultraschallbasierende B-Mode Auswertung der Auflösungsstudie Wildtyp gegen Tbx 21 ko.

(A) Graphische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der absolut gemessenen Flächen venöser Thromben in C57BL/6 Kontrollmäusen (B6) und Tbx 21 ko Mäusen. (Mittelwerte \pm SEM; two way -ANOVA/Bonferroni post test; $n=7$) (B) Prozentuale Abnahme der mittels Ultraschallanalyse in der Längsachse bestimmten Thrombenflächen, Kalkulation basierend auf der Gesamtfläche gemessen an Tag 1 (Mittelwerte \pm SEM; two way-ANOVA/Bonferroni post hoc test; $n=7$, * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$). Signifikanter Unterschied zwischen Tbx 21 ko Maus und Wildtypmaus (B6) bestehend an Tagen 10, 14 und 21.

5.2 Durchflusszytometrische Analyse der Leukozytenpopulationen im Rahmen des Auflösungsprozesses venöser Thromben in der Tbx 21 ko Maus

Im Verlauf des Auflösungsprozesses des venösen Thrombus konnte durchflusszytometrisch ein Anstieg an TCR beta positiven T-Zellen in der Venenwand sowie im Thrombenmaterial in einer C57BL/6 Maus dargestellt werden (wie in Kapitel 3 gezeigt). Die Tbx 21 ko Maus weist einen Defekt in der Entwicklung von T_H1-Lymphozyten auf, was möglicherweise Einfluss auf den prozentualen Anteil an T-Zellen sowie dem prozentualen Anteil an Monozyten/Makrophagen nehmen könnte. Da sonographisch ein hoch signifikanter Unterschied in der verbleibenden Thrombusgröße an Tag 10 und 14 dargestellt werden konnte, wurde Thrombusgewebe zu diesen Zeitpunkten extrahiert und durchflusszytometrisch auf die Oberflächenmarker CD45, Ly6G, Ly6C, F4/80 (Makrophagen spezifisches Oberflächenantigen), TCR beta und CD4 hin analysiert.

Zusammenfassend zeigten sich kaum signifikante Unterschiede in der Zusammensetzung des Thrombengewebes. Lediglich an Tag 14 bestanden tendenzielle Unterschiede für die neutrophilen Granulozyten, bestimmt als Population der Ly6G positiven Zellen mit Werten von $36,0 \pm 5,6 \%$ in der Kontrollgruppe verglichen mit $22,5 \pm 1,2 \%$ in der Tbx 21 ko Gruppe. Die Population der Ly6C positiven, inflammatorischen Monozyten zeigte ebenfalls an Tag 14 einen verringerten Wert von $1,9 \pm 0,3 \%$ in der Tbx 21 ko Maus im Gegensatz zu einem Wert von $3,4 \pm 0,8 \%$ in der Kontrollmaus (Abb. 49). Beide Zelltypen waren zu diesem Zeitpunkt in der Tbx 21 ko Maus zu einem geringeren Anteil vorhanden. Da sich ein Unterschied in der Zellzusammensetzung erst an Tag 14 zeigte, schien dies nicht der ausschlaggebende Faktor zu sein, welcher den Auflösungsprozess in der Tbx 21 ko Maus beschleunigte. Die durchflusszytometrische Analyse des Venengewebes (Graphen nicht gezeigt) ergaben keinerlei Unterschiede in der Zusammensetzung an inflammatorischen Zellen. Daraus resultierte die Frage, wie die Verschiebung zur T_H2-Immunität und eine damit verbundene, veränderte Zytokinbildung zu einer verbesserten Auflösung venöser Thromben führen könnte.

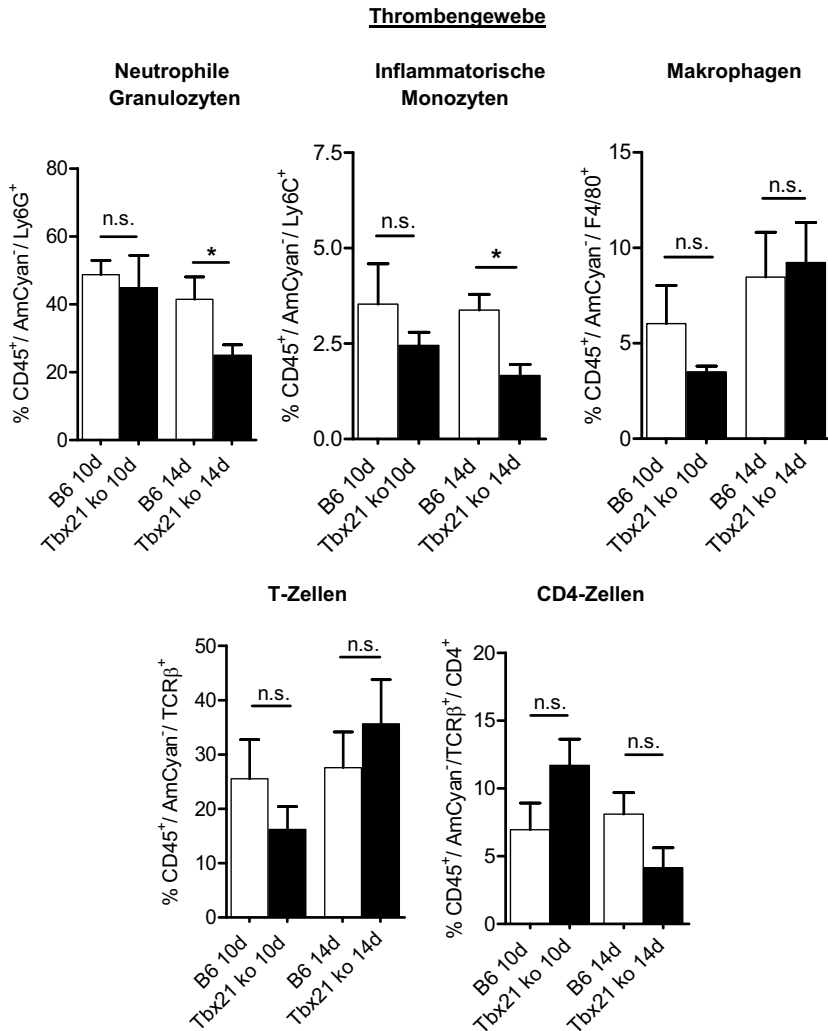


Abbildung 49: Durchflusszytometrie immunologisch markierter neutrophiler Granulozyten, infl. Monozyten, Makrophagen, T-Zellen sowie CD 4 positiver Zellen im Thrombengewebe im Modell der Tbx 21 ko Maus

Durchflusszytometrisch ermittelte Daten im Thrombengewebe 10 (10d) und 14 Tage (14d) nach Ligatur von C57BL/6 Wildtypmäusen und Tbx 21 ko Mäusen hinsichtlich der zellulären Zusammensetzung an inflammatorischen Zellen. Es wurden die Oberflächenantigene Ly6G für neutrophile Granulozyten, Ly6C für inflammatorische Monozyten, F4/80 für Makrophagen und TCR beta für T-Zellen verwendet. Außerdem wurde der Anteil an CD4 positiven Zellen in Bezug auf die T-Helferzellpopulation bestimmt (Mittelwerte \pm SEM; t-Test; n=4-5; * $p \leq 0,05$, n.s. = nicht signifikant).

5.3 Verschiebung der Zytokinmuster zur T_H2 Immunität und Reifung von M2-Makrophagen

Mit Hilfe der mRNA-Expressionsanalyse konnten aufgearbeitetes Venen- und Thrombengewebe auf eine Verschiebung der Zytokinmuster hin untersucht werden. Ein besonderes Augenmerk fanden dabei Zytokine, die zur Stimulation von M2-Makrophagen führen. Generell lassen sich Makrophagen in zwei Subtypen einteilen, die allgemein als M1 und M2 Makrophagen bezeichnet werden. Die Population der M1 Makrophagen repräsentiert den vermehrt proinflammatorischen Zelltyp, der nach Stimulation durch Ifn γ und LPS vor allem entzündungsfördernde Zytokine, wie Interleukin 1 (IL1 β) und Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) sezerniert. M2 Makrophagen dagegen zeigen eine hohe Sekretion von Interleukin 10 (IL10) sowie auch eine vermehrte Produktion von TGF beta. Besonders dem IL10 wird eine antiinflammatorische und zellprotektive Funktion zugeschrieben¹⁰⁴. Diese Population der Makrophagen spielt vor allem bei durch Antikörper vermittelten Autoimmunerkrankungen, Allergien und bei Geweberegeneration eine Rolle^{8, 94}. Im Fall der venösen Thrombose könnte eine Verschiebung zu dieser Population der Makrophagen eine schnellere Auflösung der Thromben fördern.

Im Venengewebe stellte sich deutlich eine T_H2-Verschiebung in der Tbx 21 ko Maus dar; dies zeigte sich durch einen transienten Anstieg an IL10, TGF beta und IL33 zwei Tage nach setzen der Ligatur, welcher im weiteren Zeitverlauf wieder abnahm. Im Gegensatz dazu zeigte sich ein Anstieg an IL12p40 an Tag 10 im Venengewebe der Kontrollgruppe, was für eine vermehrte T_H1-Antwort spricht (Abb. 50 und 51).

Im Vergleich zum Venengewebe zeigte sich im Thrombengewebe lediglich zwei Tage nach setzen der Ligatur ein signifikanter Anstieg von IL4, was ebenfalls auf eine T_H2-Verschiebung hinwies. Auch für MCP-1 konnte ein signifikanter Anstieg in der Tbx 21 ko Maus zwei Tage nach p.o. ermittelt werden. Jedoch zeigten sich keine Unterschiede in den Expressionswerten von TGF beta und IL33. Auch das T_H1 spezifische Zytokin IL12p40 stieg im Zeitverlauf in der Kontrollgruppe an. Die vermehrte Expression von VEGF im Thrombengewebe in der Tbx 21 ko Gruppe könnte einen Hinweis auf eine verbesserte Thrombenauflösung geben (Abb. 51).

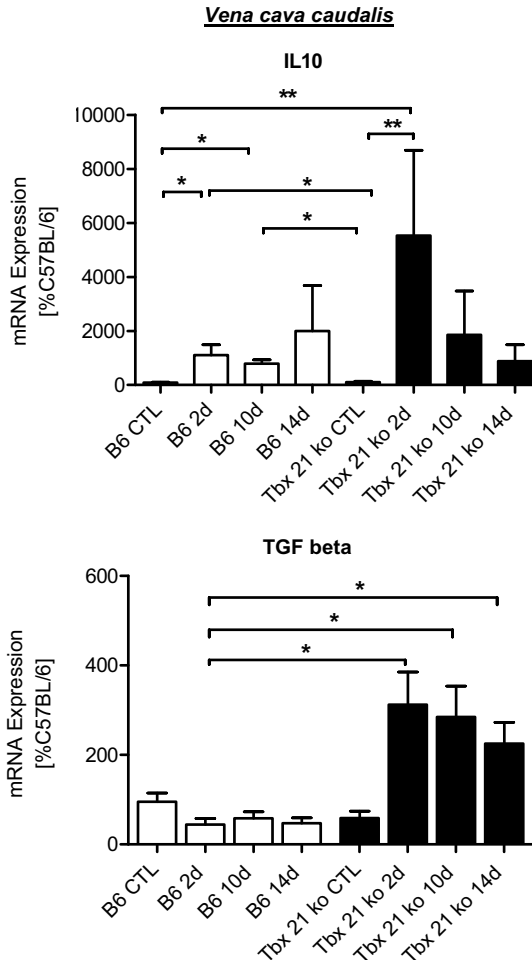


Abbildung 50: mRNA Zytokinmuster in der *Vena cava caudalis* im Modell der Tbx 21 ko Maus zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion einer venösen Thrombose.

Die Diagramme zeigen die qRT-PCR basierte Messung der mRNA Expression von IL10 und TGF beta in Venensegmenten von C57BL/6 Kontrollmäusen (B6) und Tbx 21 ko Mäusen vor der durchgeführten Venenligatur (bezeichnet als CTL) und 2, 10 sowie 14 Tage nach erfolgreicher Ligatur mit Thrombusbildung. Als Haushaltsgen wurde das TATA-box bindende Protein verwendet. Es wurden stets Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Expression der Kontrolltiere wurde auf 100% gesetzt und die Daten der ligierten Tiere im Vergleich dargestellt (Mittelwerte \pm SEM; TGF beta, IL10: Kruskal-Wallis-Test; $n=6-9$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

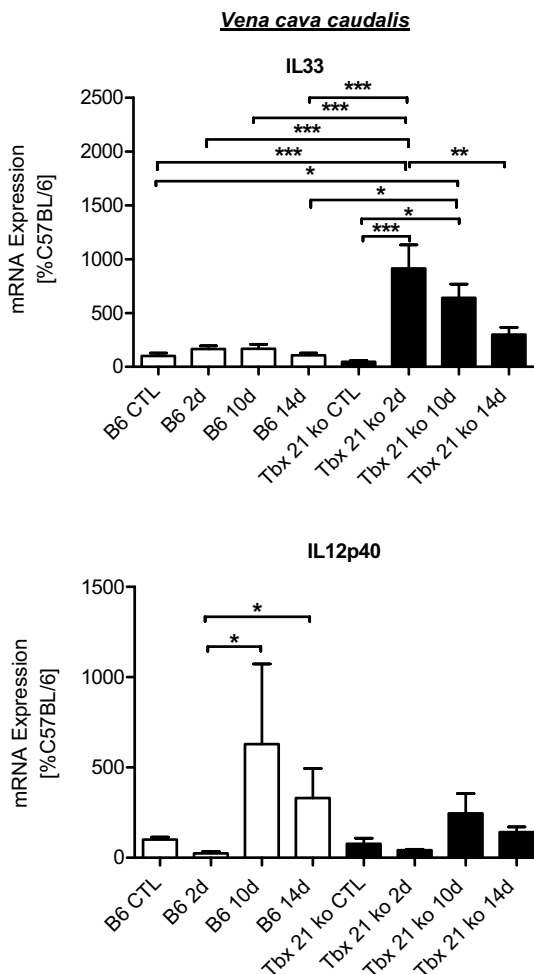


Abbildung 51: mRNA Zytokinmuster in der *Vena cava caudalis* im Modell der Tbx 21 ko Maus zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion einer venösen Thrombose.

Die Diagramme zeigen die qRT-PCR basierte Messung der mRNA Expression von IL33 und IL12p40 in Venensegmenten von C57BL/6 Kontrollmäusen (B6) und Tbx 21 ko Mäusen vor der durchgeführten Venenligatur (bezeichnet als CTL) und 2, 10 sowie 14 Tage nach erfolgreicher Ligatur mit Thrombusbildung. Als Haushaltsgen wurde das TATA-box bindende Protein verwendet. Es wurden stets Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Expression der Kontrolltiere wurde auf 100% gesetzt und die ligierten Tiere im Vergleich dargestellt (Mittelwerte \pm SEM; IL12p40 Kruskal-Wallis-Test; IL33 one way ANOVA; $n=6-9$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

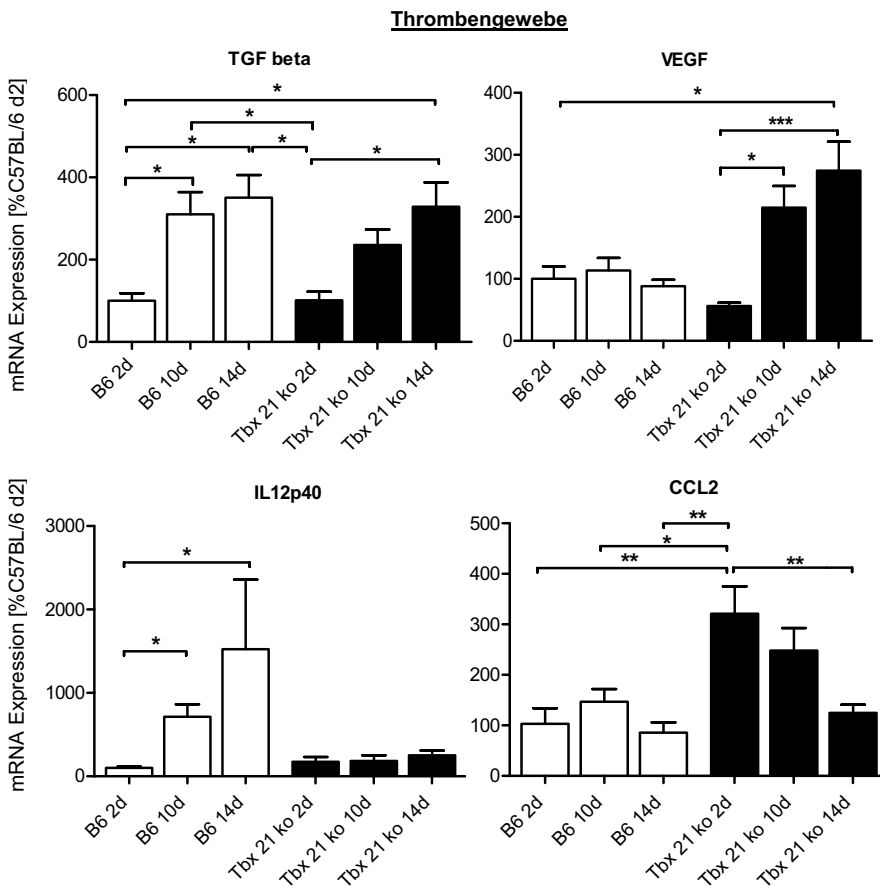


Abbildung 52: mRNA Zytokinmuster des Thrombengewebes im Modell der Tbx 21 ko Maus zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion einer venösen Thrombose.

Die Diagramme zeigen die qRT-PCR basierte Messung der mRNA Expression von TGF beta, VEGF, IL12p40 und CCL 2 in Thrombengewebe von C57BL/6 Kontrollmäusen (B6) und Tbx 21 ko Mäusen, 2, 10 und 14 Tage nach Ligatur. Als Haushaltsgen wurde beta Aktin verwendet. Es wurden stets Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Expression der ligierten Kontrollen an Tag 2 wurde auf 100% gesetzt und die restlichen Tiere im Vergleich dargestellt. (Mittelwerte \pm SEM; CCL2: one way ANOVA/Bonferroni's Multiple Comparison Test; TGF beta, VEGF, IL12p40: Kruskal-Wallis-Test; $n=4-7$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

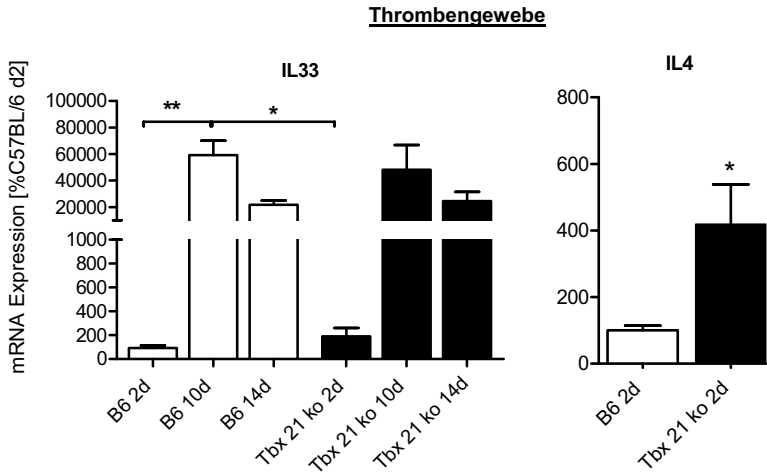


Abbildung 53: mRNA Zytokinmuster des Thrombengewebes im Modell der Tbx 21 ko Maus zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion einer venösen Thrombose.

Die Diagramme zeigen die qRT-PCR basierte Messung der mRNA Expression von IL33, und IL4 in Thrombengewebe von C57BL/6 Kontrollmäusen (B6) und Tbx 21 ko Mäusen 2, 10 und 14 Tage nach Ligatur. Als Haushaltsgen wurde beta Aktin verwendet. Es wurden stets Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Expression der ligierten Kontrollen an Tag 2 wurde auf 100% gesetzt und die restlichen Tiere im Vergleich dargestellt (Mittelwerte \pm SEM; IL33 Kruskal-Wallis-Test; IL4 t-Test; $n=4-7$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

Zusammenfassend zeigt die Tbx 21 ko Maus eine deutlich verbesserte Auflösung thrombotischen Materials in der *Vena cava caudalis*. Die dabei nur leicht veränderte Zusammensetzung inflammatorischer Zellen schien einen geringen Einfluss auf diesen Prozess zu nehmen. Andererseits zeigte die mRNA Expressionsanalyse deutliche Unterschiede im Venen- als auch Thrombengewebe; so sprechen diese Muster für ein vermehrt antiinflammatorisches Geschehen, was demnach die Auflösung begünstigte.

6. Auswirkung auf die Bildung eines venösen Thrombus in der Abwesenheit von CD4 positiven Zellen

Der prozentuale Anteil der CD4 positiven Zellen innerhalb der TCR beta Population zeigte maximale Werte von $37,1 \pm 2,7$ % im Thrombengewebe 24 Stunden nach erfolgter Ligatur der *Vena cava caudalis* (Abb. 54). Einen Einfluss auf die Thrombusentstehung wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Um eine mögliche Beteiligung bei der Bildung einer venösen Thrombose zu klären, wurde im nächsten Teil dieser Arbeit ein Antikörper (GK 1.5), gewonnen als Überstand einer Hybridomazelllinie, zur *in vivo* Depletion der CD4 positiven Zellen verwendet. Dazu erfolgte eine intraperitoneale sowie subkutane Injektion des CD4 depletierenden Antikörpers GK 1.5, in Form des Hybridomüberstandes, in C57BL/6 Mäuse vor durchgeführter Venenligatur (s. Kapitel 1.6). Die Ligatur der *Vena cava caudalis* erfolgte am 4. Behandlungstag und die Gewinnung des Thromben- sowie Venengewebes 24 Stunden danach.

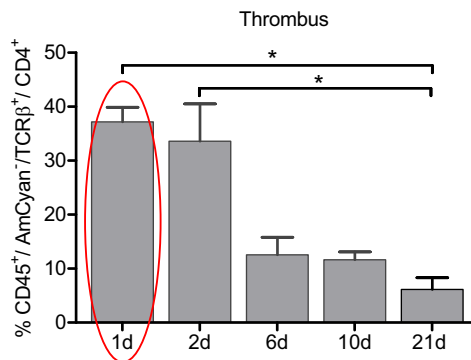


Abbildung 54: FACS-Daten der Analyse CD4 positiver T-Zellen im Thrombengewebe der C57BL/6 Maus nach *Vena cava caudalis* Ligatur.

Durchflusszytometrisch bestimmter prozentualer Anteil der CD4 positiven Zellen an der Population TCR beta positiver Lymphozyten im Thrombengewebe zu verschiedenen Zeitpunkten nach Ligatur der *Vena cava caudalis*. Im normalen Verlauf einer venösen Thrombose zeigt sich ein Abfall des prozentualen Anteils CD4 positiver Zellen (Mittelwerte \pm SEM; Kruskal-Wallis Test; $n=5$; * $p \leq 0,05$).

Auf eine Depletionskontrolle des Blutes vor der Ligatur der *Vena cava caudalis* wurde verzichtet, um hierbei keine Blutparameter zu verändern. Der Erfolg der Depletion wurde im extrahierten Venen- und Thrombengewebe bestimmt und es

wurden nur Tiere in die Auswertung aufgenommen, bei denen eine Reduzierung der CD4 positiven Zellen nachweisbar war.

Naive CD4 positive Zellen können durch Freisetzung verschiedener Zytokinmuster die Stimulation bestimmter Subpopulationen von T-Zellen herbeiführen, welches in der Differenzierung zu Th1, Th2, Th17 oder regulatorischen T-Zellen resultiert (Abb. 4). Eine Depletion der CD4 positiven Population könnte somit den Einfluss zur Ausbildung von T_H1- und T_H2 spezifischen Zellen unterbinden, was sich weiterhin auch auf andere Zellen auswirken könnte, vor allem auf neutrophile Granulozyten und Monozyten, welche die hauptsächliche Rolle im Geschehen der venösen Thrombose spielen. Betrachtet man Thrombengewicht und -länge von Mäusen nach GK 1.5 Behandlung, bei denen eine erfolgreiche Depletion der CD4 positiven Zellen durchflusszytometrisch festgestellt werden konnte, so ergaben sich im direkten Vergleich mit Werten der Kontrollgruppe lediglich tendenzielle Unterschiede für beide Parameter (Abb. 54). Um herauszufinden, welchen Einfluß die Depletion der CD4 positiven Helferzellen auf die anderen im Thromben- und Venengewebe enthaltenen Zellen besitzt, wurden diese Gewebe nach Extraktion mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die Antikörper (GK 1.5) induzierte Depletion der CD4 positiven Zellen zeigte eine deutliche Reduzierung dieser Population im Venensegment mit prozentualen Werten von $3,0 \pm 1,9$ % im Vergleich zu $22,1 \pm 6,3$ % in der Kontrollgruppe. Die Depletion beeinflusste weder den prozentualen Anteil an Monozyten, bestimmt als CD11b positive/Gr1 negative Zellen, noch den prozentualen Anteil an neutrophilen Granulozyten (CD11b/Gr1 positiv) im Venengewebe (Abb. 56) 24 Stunden nach erfolgter Ligatur der *Vena cava caudalis*.

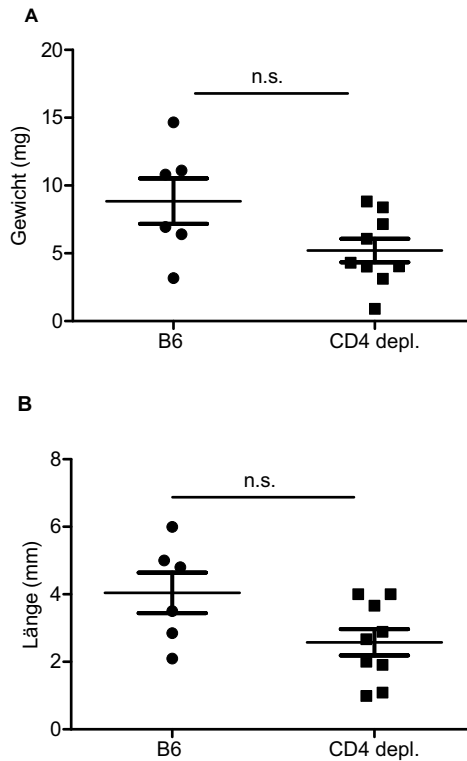


Abbildung 55: Vergleichende Darstellung von Thrombengewicht und -länge zwischen CD4 depletierter und Kontrollmaus (C57BL/6).

(A) Vergleichende Darstellung des Thrombengewichtes, ermittelt 24 Stunden nach erfolgter Ligatur der *Vena cava caudalis* im präparierten Thrombengewebe. (A) Die Thromben von mit CD4 spezifischen Antikörper GK 1.5 behandelten Mäusen wiesen ein tendenziell geringeres Gewicht auf; es bestand kein signifikanter Unterschied (Mittelwerte \pm SEM; t-Test; $n=6-9$; n.s. = nicht signifikant) (B) Die Thromben der Kontrolltiere erwiesen sich als tendenziell länger als diejenigen der CD4 depletierten Mäuse (Mittelwerte \pm SEM; t-Test; $n=6-9$; n.s. = nicht signifikant).

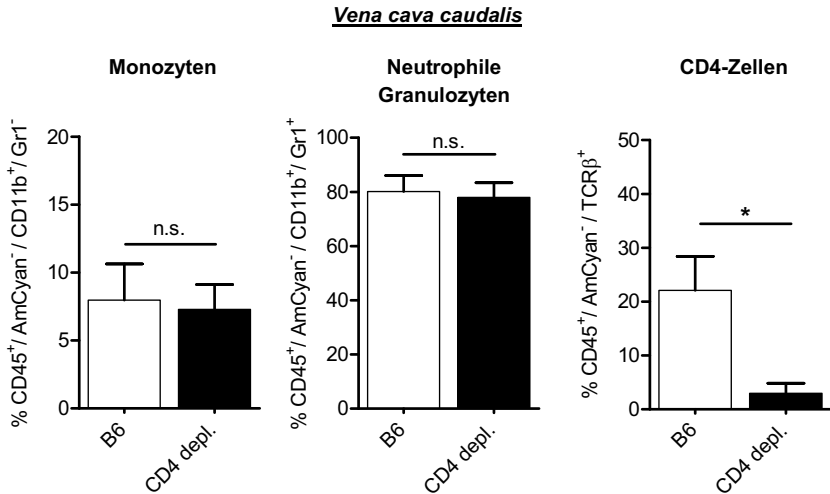


Abbildung 56: Durchflusszytometrisch bestimmte zelluläre Zusammensetzung des Venengewebes aus Kontroll- und CD4 depletierten Mäusen mit Ligatur der *Vena cava caudalis*.

Durchflusszytometrisch ermittelte prozentuale Veränderung an CD45 positiven/Gr1 negativen Monozyten, CD45 positiven/Gr1 positiven neutrophilen Granulozyten und TCR beta positiven CD4 Zellen im direkten Vergleich zwischen Kontrollmäusen (C57BL/6) und CD4 depletierten Mäusen im Venengewebe. Die Präparation erfolgte 24 Stunden nach Ligatur und zu voriger Depletion CD4 positiver durch Behandlung mit dem CD4-spezifischen Antikörper GK 1.5 (Mittelwerte \pm SEM; t-Test; $n=4-5$; * $p \leq 0,05$, n.s. = nicht signifikant).

Betrachtet man die Auswirkungen auf zellulärer Ebene im Thrombusgewebe, so zeigte sich auch hier eine deutliche Reduzierung der CD4 positiven Zellen, mit prozentualen Werten von $0,3 \pm 0,2$ % im Vergleich zu $44,1 \pm 4,4$ % für die Kontrollmäuse. Im Vergleich zum Venensegment zeigte sich im Thrombengewebe auch der prozentuale Anteil an Gr1 negativen Monozyten bei den CD4 depletierten Mäusen als deutlich reduziert, mit prozentualen Werten von $0,9 \pm 0,2$ % im Vergleich zur Kontrollgruppe ($2,1 \pm 0,4$ %). Diese Verringerung monozytärer Zellen könnte demnach das Resultat einer fehlende Zytokinbildung aus CD4 positiven Zellen sein. Eine Auswirkung der Depletion auf den prozentualen Anteil neutrophiler Granulozyten konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 57).

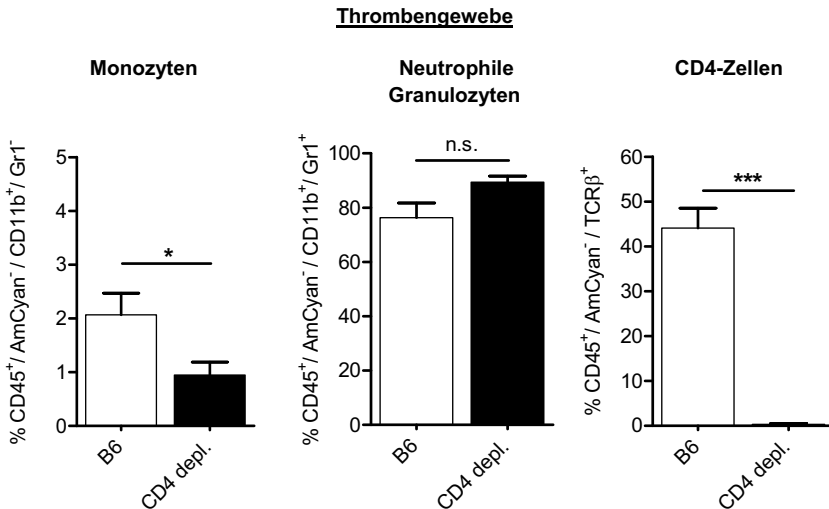


Abbildung 57: Durchflusszytometrisch bestimmte zelluläre Zusammensetzung des Thrombengewebes aus Kontroll- und CD4 depletierten Mäusen mit Ligatur der *Vena cava caudalis*.

Durchflusszytometrisch ermittelte prozentuale Veränderung an CD45 positiven/Gr1 negativen Monozyten, CD45 positiven/Gr1 positiven neutrophilen Granulozyten und TCR beta positiven CD4 Zellen im direkten Vergleich zwischen Kontrollmäusen (C57BL/6) und CD4 depletierten Mäusen im Thrombengewebe. Die Präparation erfolgte 24 Stunden nach Ligatur und vorhergehender Depletion CD4 positiver Zellen durch Behandlung mit dem CD4-spezifischen Antikörper GK 1.5 (Mittelwerte \pm SEM; t-Test; n=4-5; * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$, n.s. = nicht signifikant).

Die Verringerung des prozentualen Anteils der Population CD4 positiver Zellen im Venen- und Thrombengewebe beeinflusste keineswegs die Entstehung einer venösen Thrombose im *Vena cava caudalis* Stenose Modell. Dennoch besaßen die mit dem Hybridomaüberstand behandelten und somit depletierten Tiere tendenziell geringere Thrombengewichte und -längen. Auch der im Thrombengewebe verringerte prozentuale Anteil CD11b positiver/Gr1 negativer Monozyten könnte eine mögliche Ursache für den tendenziellen Unterschied in Thrombengewicht und -länge darstellen.

VI. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Zusammensetzung an inflammatorischen Zellen im Prozess der Thrombenentstehung und der Thrombenauflösung im Stenose Modell der *Vena cava caudalis* der Maus untersucht. Hierbei sollte vor allem die Rolle von Monozyten/Makrophagen im Depletionsmodell der LysMCre-iDTR Maus näher betrachtet werden sowie die Auswirkungen einer Verschiebung zur T_H2-Immunität im Modell der Tbx 21 knockout Maus.

1. Standardisierung und Evaluation der sonographischen Darstellung von venösen Thromben

Sonographische Untersuchungen stellen in der Humanmedizin ein nicht invasives diagnostisches Mittel zur Darstellung von tiefen Beinvenenthrombosen dar und bieten die Möglichkeit, deren Verlauf weiter zu verfolgen. Mit Hilfe der B-Mode Darstellung kann unter anderem eine Inkompressibilität des betroffenen Gefäßes dargestellt werden (Kompressionssonographie) und die Verwendung eines Farbdopplers erleichtert das Aufsuchen der Gefäße sowie die Bestimmung der Flussgeschwindigkeit und der Richtung des Blutflusses²⁷. Nicht nur im humanmedizinischen Bereich sondern auch in der Grundlagenforschung findet dieses nicht invasive Verfahren Verwendung^{1, 11, 24}. Die Untersuchung von Labormäusen stellt sich als geringfügig schwieriger dar, bedingt durch einen erhöhten apparativen Aufwand zur Narkotisierung und Fixierung der Maus. Auch die Möglichkeit zur Nutzung von Hochfrequenzultraschall (HFUS) ist ein limitierender Faktor. Im Gegensatz zur Humanmedizin, wo Frequenzen von 2 – 8 Megahertz Verwendung finden, werden bei der Untersuchung von kleinen Laborsäugetern Frequenzen von 30 - 50 Megahertz benötigt.

Im Bereich der Thromboseforschung zeigten Diaz et al. (2010) erstmals Ultraschallbilder einer *Vena cava caudalis* vor und nach Induzierung einer venösen Thrombose mittels elektrolytischer Stimulation²⁴. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf der Bestimmung des verbleibenden Blutflusses. Zwei Jahre später veröffentlichten Aghourian et al. (2012) weitere Daten zur Verwendung von HFUS im Zusammenhang mit der Darstellbarkeit venöser Thromben für die Maus¹. Basierend auf der Tatsache, dass diese Methode bereits reproduzierbare Ergebnisse lieferte, bisher aber noch nie im *Vena cava caudalis* Stenose Modell verwendet wurde,

erfolgte in der vorliegenden Arbeit eine Überprüfung der Darstellung von ermittelten Längenwerten.

Ein essentieller Punkt zur Ausbildung venöser Thromben im *Vena cava caudalis* Stenose Modell, verglichen mit bereits in der Einleitung angesprochenen ähnlichen Modellen zur Thrombusbildung in der *Vena cava caudalis*, ist die Reduzierung der Flussgeschwindigkeit im Gefäß um 80%. Diese signifikante Reduktion des Blutflusses konnte unter Verwendung der Duplexsonographie ermittelt werden. Für die Messungen der Thrombenlänge zum einen mit Hilfe des HFUS und zum anderen nach Extraktion des Thrombenmaterials konnte für den Zeitpunkt zwei Tage nach Stenosierung des Gefäßes eine Korrelation dieser Werte von $r^2=0,9734$ bestimmt werden. Diese hohe Korrelation spricht für eine Reproduzierbarkeit der Messung von Thrombusparametern mit Hilfe des HFUS im *Vena cava caudalis* Stenose Modell. Ein positiver Aspekt dieser Methode stellte das nicht invasive Arbeiten dar, welches longitudinale Studien nach Induzierung einer venösen Thrombose erlaubt und in dieser Arbeit Verwendung finden sollte.

2. Genauere Betrachtung des verwendeten Mausmodelles und Darstellung des Einflusses venöser Seitenäste auf die Thrombenentstehung

Diaz et al. (2012) veröffentlichten einen detaillierten Überblick über die Möglichkeiten, eine venöse Thrombose im Mausmodell durch die Nutzung der *Vena cava caudalis* herbeizuführen²⁵. Jedes der vier beschriebenen Modelle ist mit gewissen Vor- und Nachteilen behaftet. Dennoch konnten alle Modelle einen Beitrag zur Aufklärung verschiedener Mechanismen im Geschehen der venösen Thrombose leisten. Möglichst sollte das gewählte Modell dabei die tiefe Venenthrombose im menschlichen Körper imitieren, was aufgrund anatomischer Verhältnisse, wie dem fehlenden aufrechten Gang und der Abwesenheit von Venenklappen in der *Vena cava caudalis* der Maus, kaum realisierbar ist. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Stenose Modell wurde erstmals von Singh et al. (2002) mit Verwendung eines vaskulären Clips vorgestellt¹⁴² und von Brühl et al. (2012) modifiziert und durch die Verwendung eines starren Platzhalters als Modell ohne Endothelschädigung etabliert¹⁵⁵. Da es durch einen weiterhin vorhandenen Blutfluss im Gefäß und durch ein intaktes Endothel beste Voraussetzungen bietet, eine tiefe Beinvenenthrombose des Menschen zu imitieren, verglichen mit anderen Modellen¹⁵⁵, sollte es in dieser Arbeit verwendet werden.

Auch das *Vena cava caudalis* Stenose Modell weist jedoch gewisse Nachteile auf. Hierzu zählt vor allem die Varianz in der Thrombengröße, welche es schwierig machte, Vergleiche zwischen unterschiedlichen Behandlungsgruppen darzustellen. Ein möglicher Einflußfaktor in diesem Zusammenhang könnten die in die *Vena cava caudalis* einmündenden Seitenäste darstellen. Dabei zeigt die Maus verschiedene anatomische Variationen; so können ein bis zwei laterale Gefäße vorhanden sein und sich auch im dorsalen Bereich Abgänge in verschiedener Anzahl befinden^{23, 87}. Bei genauerer Betrachtung mit Hilfe von HFUS stellten sich die in die *Vena cava* einmündenden lateralen sowie dorsalen Gefäße als beeinflussender Faktor der Thrombengröße dar. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, bewirkte eine Ligatur der sichtbaren lateralen Seitenäste keine konstantere Thrombusgröße; somit haben vermutlich die dorsalen, schwer zugänglichen Abgänge einen essentiellen Einfluss im Geschehen der Thrombusbildung. Die im Übergang zur *Vena cava* bestimmten Flussgeschwindigkeiten spielten eine untergeordnete Rolle und lediglich die Insertionsstelle sowie der Abstand zur durchgeführten Ligaturstelle beeinflussten die Thrombusbildung maßgebend. Bei Tieren, die nach erfolgter *Vena cava caudalis* Ligatur keinen Thrombus entwickeln, sollte der Einfluss der in die *Vena cava* mündenden Seitenäste bedacht und vor Interpretation von Studienergebnissen ausgeschlossen werden. Sollten Tiere diese Besonderheit aufweisen, so wurden die gewonnenen Daten von der Analyse ausgeschlossen, um Veränderungen in der Formation richtig zu deuten, was in dieser Arbeit berücksichtigt wurde.

3. Evaluation der FACS-Analyse von Thromben- und Venengewebe zur Untersuchung der vorhandenen Leukozytenpopulation

Ein Teil dieser Arbeit bestand in der Etablierung einer neuen Methode zur Untersuchung von Thromben- und Venengewebe. Die durchflusszytometrische Analyse ergab die Möglichkeit, in einer Gewebeprobe durch die Verwendung verschiedener Fluorochrom gekoppelter Antikörper unterschiedliche Zellpopulationen der Leukozyten in einem Punktediagramm darzustellen. Diese Methode wurde bereits mit Aortengewebe durchgeführt^{71, 159} und in leicht abgewandelter Form für die Aufarbeitung des venösen Gewebes verwendet.

Verschiedene Studien im Stasis Modell der *Vena cava caudalis* der Maus zeigten einen auf histologisch analysierten Gewebeschnitten basierenden Verlauf der Leukozytenzusammensetzung im Thrombengewebe. Nosaka et al. (2008)

veröffentlichen Daten über die prozentuale Veränderung der Population von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen über einen Zeitraum von drei Wochen¹¹³. Diese Erkenntnisse sollten vor allem der forensischen Beurteilung zur Altersbestimmung von venösen Thromben dienen. Histologisch ermittelt stellte sich in der Studie von Nosaka et al. (2008) ein kontinuierlicher Abfall an Myeloperoxidase exprimierenden neutrophilen Granulozyten im Thrombengewebe bis Tag 21 dar¹¹³. Betrachtet man den zeitlichen Verlauf dieser Population im Rahmen der vorliegenden Arbeit (gemessen als CD11b⁺/Gr1⁺) mit Hilfe der Durchflusszytometrie, so ergaben sich keinerlei Unterschiede. Auch die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Verlaufskurve von Monozyten (gemessen als CD11b⁺/Gr1⁻) zeigte einen ähnlichen Verlauf wie in der Studie von Nosaka et al. (2008). Der maximale Anteil an F4/80 immunpositiven Makrophagen zeigte sich in dieser Veröffentlichung an Tag 7, in einer weiteren Publikation von Nosaka et al. (2011) lag der maximale Wert von Makrophagen im Thrombengewebe um Tag 10¹¹⁵. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe der Durchflusszytometrie maximale Werte für Monozyten an Tag 10 dargestellt werden. Die Leukozytenkinetik in der Venenwand gestaltete sich ähnlich der zeitlichen Verteilung der im Thrombengewebe vorhandenen Zellen¹⁵⁶. Obwohl ein abweichendes Modell verwendet wurde und das Hauptaugenmerk auf den lebenden aktiven Zellen lag, sprechen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit für eine weitere vergleichbare Methode, um inflammatorischen Zellen vor allem im Thrombengewebe darzustellen.

Andere leukozytäre Zellpopulationen, wie T-Zellen und deren Subpopulation CD4 positiver Zellen sowie Natürliche Killerzellen (NK) wurden in bisherigen Studien zur Thrombenentstehung und -auflösung kaum berücksichtigt. Lediglich eine neue Studie von Hish et al. (2014) zeigte histologische Daten zur Anwesenheit von Lymphozyten in der Venenwand nach Induktion einer Thrombose im Mausmodell. Die Befunde der vorliegenden Arbeit zeigten einen prozentualen Anstieg an TCR beta positiven Zellen im Verlauf des Auflösungsprozesses eines venösen Thrombus. Da nicht nur der prozentuale Anteil an Zellen im Thrombengewebe, sondern auch im Venengewebe anstieg, scheint diese Zellart den Prozess der Thrombenauflösung zu unterstützen. Jedoch bestand vor allem zu den späten Zeitpunkten nur ein geringer Anteil an T-Zellen aus CD4 positiven Zellen. Somit wäre der Einfluss auf den Auflösungsprozess fraglich. In der vorliegenden Arbeit wurde eine weitere TCR beta positive Zellpopulation betrachtet, welche zusätzlich zu diesem Oberflächenprotein

den Oberflächenmarker NK 1.1 exprimiert. Diese als NKT-Zellen bezeichnete Population ist vor allem in der Lage, große Mengen an $\text{Ifn}\gamma$ zu produzieren und ihr daraus resultierender $\text{T}_{\text{H}}1$ Phänotyp wurde vorwiegend für die C57BL/6 Maus beschrieben^{7, 91}. Ein Anstieg dieser Zellpopulation im Auflösungsprozess einer venösen Thrombose könnte demnach diesen Prozess negativ beeinflussen, da die bereits veröffentlichten Daten von Nosaka et al. (2011) eine verbesserte Auflösung thrombotischen Materials in Abwesenheit von $\text{Ifn}\gamma$ beschreiben¹¹⁵. Weitere TCR beta positive Populationen, die in diesem Zusammenhang involviert sein könnten, wären zytotoxische T-Zellen, welche zusätzlich ein CD8 Oberflächenprotein exprimieren und durch die Sekretion von Perforin und Granzymen zur Apoptose von normalerweise virusinfizierten Zellen sowie entarteten Zellen führen⁶⁵. Die Erkennung von Antigenen ohne Costimulation führt zu einer Inaktivierung der betroffenen T-Zelle, dieser Prozess wird auch als Anergie bezeichnet. Diese Reaktion soll vor allem autoimmune Reaktionen verhindern^{65, 86}. Anergie T-Zellen müssen demnach kein zusätzliches CD4 oder CD8 Oberflächenprotein besitzen und könnten auch einen Anteil an TCR beta positiven Zellen darstellen.

Vor allem NK-Zellen stellen zusätzlich zu $\text{T}_{\text{H}}1$ -Zellen auch eine wichtige Quelle für $\text{Ifn}\gamma$ dar^{132, 153}, was vor allem den Auflösungsprozess venöser Thromben beeinflusst¹¹⁵. In beiden Geweben konnten diese Zellen nachgewiesen werden, jedoch lässt der geringe prozentuale Anteil vermuten, dass diese Population eine eher untergeordnete Rolle spielt.

Zusammenfassend konnten in der vorliegenden Arbeit, neben den bereits in der Literatur vielfach beschriebenen monozytären Zellen und neutrophilen Granulozyten weitere Zellpopulationen wie T-Zellen, CD4 positive Zellen, NKT-Zellen und NK-Zellen im Geschehen einer venösen Thrombose nachgewiesen werden. Außerdem zeigte sich die Verwendung der Durchflusszytometrie zur Bestimmung des prozentualen Anteils verschiedener Zellpopulationen als geeignete Methode, da diese vor allem für die Messungen von Monozyten und neutrophilen Granulozyten, verglichen mit bereits publizierten Daten, reproduzierbare Ergebnisse lieferte.

4. Auswirkung auf die Thrombenentstehung und -auflösung im Modell der LysMCre-iDTR Maus

4.1 Eine Depletion monozytärer Zellen zeigt keinen Einfluss auf die Entstehung einer venösen Thrombose im Mausmodell der LysMCre-iDTR Maus

Die Hauptfragestellung dieser Arbeit war es, inwieweit die Depletion von Monozyten/Makrophagen zu Veränderungen im Entstehungs- sowie Auflösungsprozess einer venösen Thrombose führt. Um diese Fragestellung zu untersuchen, wurde mit Hilfe der LysMCre-iDTR Maus ein Modell zur Ablation von myelomonozytären Zellen verwendet.

Die Bedeutung von Monozyten für die Entstehung einer venösen Thrombose wird durch die Tatsache unterstrichen, dass Monozyten die hauptsächliche Quelle von im Blut vorhandenem Thromboplastin (TF) darstellen^{137, 155}. Thromboplastin, auch als Gerinnungsfaktor III bezeichnet, zählt zu den Schlüsselementen der extrinsischen Gerinnungskaskade. Klinisch zeigen Patienten mit einer tiefen Venenthrombose erhöhte Konzentrationen an monozytär gebundenem TF; somit handelt es sich bei TF um einen sensitiven und spezifischen Marker für die Diagnose einer venösen Thrombose¹⁵². Auch im Mausmodell konnten von Bruehl et al. (2012) mit Hilfe der Intravitalmikroskopie zeigen, dass Monozyten zu den initialen Zellen im Entstehungsprozess eines venösen Thrombus gehören. Des Weiteren zeigte diese Arbeitsgruppe mit Hilfe einer genetisch veränderten Maus, welche nur geringe Mengen an humanem TF und kein speziesspezifisches TF produziert, dass die Fibrinformtion bei diesen Tieren ausblieb und sich keine Thrombusbildung einstellte¹⁵⁵.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Depletionsschema im Modell der LysMCre-iDTR Maus zeigte eine deutliche Reduktion an Monozyten in Blutproben und in den Gewebeproben der mit Diphtherietoxin behandelten Tiere. Außerdem konnte eine Verschiebung zum granulozytären Blutbild dargestellt werden, was sich in einer deutlichen Erhöhung des prozentualen Anteiles an neutrophilen Granulozyten zeigte. Unterschiede in der Thrombengröße konnten jedoch nicht detektiert werden. Da eine hundertprozentige Ablation dieser Zellen nicht gegeben war, könnte somit noch der geringe Anteil von Monozyten Auswirkungen auf die

Gerinnungskaskade besitzen. Gerade unter dem Aspekt einer herbeigeführten Hypoxie im Abschnitt der Venenligatur führt diese Situation weiterhin zur Stimulation der dort befindlichen Monozyten und zur Expression von TF⁷⁶. Unter Berücksichtigung des Anstieges des prozentualen Anteils an neutrophilen Granulozyten im Blut kann der eigentliche Effekt einer Depletion der monozytären Zellen möglicherweise überdeckt werden. Neutrophile Granulozyten nehmen in der initialen Phase einer venösen Thrombose im Mausmodell den Hauptanteil an adhärierenden Zellen ein¹⁵⁵. Vor allem die Expression des Zelladhäsionsmoleküles P-Selektin durch das Endothel im ligierten Abschnitt führte zum vermehrten „rolling“ und schlussendlich zur Adhäsion dieser inflammatorischen Zellen^{110, 155}. Doch auch durch die Bildung und Freisetzung von extrazellulären DNA-Protein Komplexen, den sogenannten "neutrophil extracellular traps" tragen diese Zellen zur Initiierung einer venösen Thrombose bei^{40, 155}. Dieser als NETosis bezeichnete Prozess erfolgt vor allem in größeren venösen Gefäßen, wenn diese einer Flussverminderung ausgesetzt werden^{12, 155}. Darüber hinaus sind Monozyten in der Lage, solche DNA-Protein Komplexe freizusetzen¹⁵ und ihren Beitrag zur Entstehung einer venösen Thrombose zu leisten. Die verringerte Anzahl an Monozyten im Venensegment könnte einen erhöhten Influx von T-Zellen zur Folge haben, um hier eine verbesserte Stimulation der Einwanderung von monozytären Zellen zu bewirken. Eine genaue Ursache als Erklärung für den erhöhten prozentualen Anteil an TCR beta positiven Zellen im Venengewebe der LysMCre-iDTR-Gruppe kann nicht benannt werden.

4.2 Eine Longitudinalstudie zeigte eine verbesserte Reduktion der Thrombenfläche im Mausmodell der LysMCre-iDTR Maus

Monozyten/Makrophagen repräsentieren die bezeichnende Population eines im Auflösungsprozess befindlichen Thrombus. Dies gilt nicht nur für menschliches Thrombenmaterial, sondern lässt sich auch in vielen tierexperimentellen Modellen reproduzieren^{98, 113, 156}. Ihnen wird eine fibrinolytische, proangiogenetische und gewebsmodulierende Funktion zugesprochen¹²⁶. Sie wandern aus dem umliegenden Gewebe ein oder entstammen aus dem Reservoir der Milz¹⁴³. Modarai et al. (2005) zeigten, dass auch aus dem Knochenmark endotheliale Vorläuferzellen in den Thrombus einwandern welche einen Makrophagen-Phänotyp aufweisen⁹⁹. Sie phagozytieren Zelltrümmer, stimulieren durch die Expression von VEGF das Entstehen neuer Gefäßkanäle und fördern durch die Expression von Fibroblasten

Wachstumsfaktor (FGF) die Fibrosierung des betroffenen Bereiches^{90, 99, 126, 157, 30}, wobei die Fibrinolyse vor allem durch die Freisetzung von Urokinase-Plasminogen-Aktivator (uPA) erfolgt. Versuche in der uPA knockout Maus zeigten eine geringere Einwanderung von Monozyten mit verschlechterter Auflösung des Thrombus¹⁴¹.

Die genaue Funktion der Monozyten/Makrophagen konnte bisher dennoch nicht bis ins Detail geklärt werden. Eine Depletion könnte zu einer Verschlechterung der Thrombenauflösung führen, vergleichend mit der Wundheilungsstudie von Goren et al. (2009) in der es durch die Depletion in der LysMCre-iDTR Maus zu einer Verzögerung der Abheilung von Hautläsionen kam⁴⁷. Interessanterweise zeigten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit das genaue Gegenteil. Eine Auflösung erfolgte in der depletierten Maus signifikant besser bezogen auf die prozentuale Flächenabnahme. Die Daten wiesen einen deutlichen Unterschied zwischen depletierten LysMCre-iDTR Mäusen und LysMCre Kontrollmäusen an Tag 6 und Tag 10 auf. Wie bisherige Daten der Literatur zeigen und zuvor im Rahmen dieser Arbeit beschrieben wurde, ist dies der Zeitraum in dem der Gehalt an Monozyten im Thrombenmaterial am größten ist^{113, 115}. Bei Vergleich der absoluten Querschnittsflächen der Thromben beider Gruppen ergab sich für die LysMCre-iDTR Gruppe eine im Allgemeinen signifikant größere Fläche. Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass die größeren Querschnittsflächen der venösen Thromben in der Monozyten-depletierten LysMCre-iDTR Maus möglicherweise einem Depletionsartefakt zuzuschreiben sind. Frantz et al. (2013) bestätigten die Hypothese der verzögerten Heilungseffekte bei Depletion von Monozyten/Makrophagen nach einem Myokardinfarkt im Mausmodell³⁸. Erstaunlicherweise zeigten Frantz et al. (2013) in den veröffentlichten Daten, dass die Depletion im LysMCre-iDTR Modell sowie eine Depletion unter der Verwendung von Chlodronat zu einem vermehrten Auftreten von intrakardialen Thromben führte. Einen Einfluss auf das Gerinnungssystem und eine Plättchenaktivierung konnte von dieser Arbeitsgruppe ausgeschlossen werden. Durch die Depletion hervorgerufene Artefakte können dementsprechend nicht außer Acht gelassen werden und finden in den nächsten Abschnitten der Diskussion nähere Betrachtung.

4.3 Ein hoher Anteil an Monozyten im Thrombengewebe verbessert die Auflösung

Die Untersuchung von Blut- und Gewebeproben 48 Stunden nach induzierter Stenose zeigte teilweise unerwartete Ergebnisse. In den Blutproben stellte sich, wie im langen Depletionsregime der Entstehungsstudie eines venösen Thrombus eine deutliche Verringerung des prozentualen Anteils an Monozyten dar und auch hier erwies sich der prozentuale Anteil an neutrophilen Granulozyten in der behandelten LysMCre-iDTR Maus als deutlich erhöht. Im Venensegment blieb der Anteil an Monozyten in beiden Gruppen annähernd gleich; im Gegensatz dazu war der Anteil an Monozyten im Thrombengewebe der LysMCre-iDTR Maus stark erhöht. Vergleicht man dieses Ergebnis mit den durchflusszytometrisch ermittelten Daten in der Wildtyp Maus, so würde sich der Thrombus schon in einem Stadium befinden, welches sich an Tag 6 nach Ligatur darstellte. Die Analyse der mRNA Expression im Thrombengewebe der LysMCre-iDTR Maus ergab einen deutlichen Anstieg für TF, CCL2 (MCP-1) und IL4. Ali et al. (2006) konnten einen starken Einfluss von MCP-1 im Auflösungsprozess venöser Thromben nachweisen. Demnach führte eine Injektion von MCP-1 in das Thrombengewebe zu einer verbesserten Auflösung, jedoch zeigte sich hierbei kein Einfluss auf die Rekrutierung von Monozyten in das Thrombengewebe³. Bei einem Gen knockout von MCP-1 im Auflösungsprozess waren keine Unterschiede darstellbar. Somit scheint es laut Literatur keine Korrelation zwischen den im Thrombengewebe erhöhten prozentualen Anteil an Monozyten und der deutlich erhöhten mRNA Expression von MCP-1 zu geben.

In Bezug auf die Immunantwort wird ganz allgemein ein modulierender Einfluss von MCP-1 auf die T-Zellimmunität beschrieben. Dabei ergibt sich ein Zusammenhang mit der Expression von MCP-1 und der Entwicklung von T_H2-Immunantworten aufgrund einer stimulierten IL4 Freisetzung durch T-Zellen²¹. Diese Freisetzung förderte die Entwicklung von sogenannten "alternativ" aktivierten Makrophagen, die eine eher antiinflammatorische Aktivität besitzen¹⁶⁵. Ein in diesem Zusammenhang bestehender Einfluss auf die T-Zellpopulation, welche im Venensegment der LysMCre-iDTR Maus eine deutliche Verminderung zeigte, wäre möglich.

Im Verlauf der Apoptose kommt es zum sogenannten "blebbing" der Plasmamembran. Dabei entstehen Membranvesikel, die den Abbau der Zelle

unterstützen. Es kommt zusätzlich zu einer Externalisierung von Phosphatidylserin (PS), einem Phospholipid, welches sich normalerweise in der inneren Lipidschicht der Zellmembran befindet¹⁰¹. Dies dient zur Stimulierung der Phagozytose, um den endgültigen Abbau der Zelle zu bewirken. Im Allgemeinen entstehen im Prozess der Apoptose sogenannte apoptotische Körperchen, auch als Mikropartikel (MP) bezeichnet, die wie in der Literatur beschrieben durch die Expression von PS und TF prokoagulatorische Eigenschaften besitzen und Einfluss auf die Entstehung einer venösen Thrombose nehmen^{75, 117}. Die im Blut zirkulierenden MPs nehmen ihren Ursprung von Endothelzellen, Leukozyten, Erythrozyten oder Thrombozyten. Bei einem gesunden Menschen können nur geringe Mengen an MPs im Blut detektiert werden, welche hauptsächlich von Thrombozyten stammen¹²⁰. Die erhöhte Expression von TF könnte durch die im Thrombengewebe vorhandenen monozytären Mikropartikel, welche beim Untergang dieser Zellen frei werden, erklärt werden. Außerdem spricht vor allem der erhöhte Anteil an Monozyten im Thrombengewebe für einen Anstieg von TF. Die im Ligationsabschnitt bedingte Hypoxie führte demnach auch zu einer Stimulation der Expression von TF in Monozyten und zur Freisetzung von TF-positiven Mikropartikeln⁷⁶. Allgemein wird diesen Körperchen auch ein fibrinolytisches Potential zugesprochen. Vor allem MPs deren Ursprung leukozytäre Zellen darstellen, besitzen auf ihrer Oberfläche alle Faktoren, die für die Bildung von Plasmin benötigt werden⁷⁴. Die vermehrte Anwesenheit von apoptotischen Zellen im entstandenen Thrombus könnte demnach auch zu einer Beeinflussung der entzündlichen Reaktion führen, da Makrophagen im Falle der Phagozytose von dieser Zellen eine Entzündung unterdrücken¹²⁵. Eine Expression proangiogenetischer Faktoren wie vor allem VEGF steigt im Auflösungsprozess eines venösen Thrombus an¹⁵⁷. Vor allem Monozyten exprimieren proangiogenetische Faktoren wie IL8, bFGF und VEGF⁹⁸. Eine Erhöhung des Anteils an Monozyten im Anfangsstadium könnte demnach die Angiogenese im Thrombus schneller vorantreiben und den Auflösungsprozess zusätzlich beschleunigen.

Zusammenfassend zeigt die Auflösungsstudie eines venösen Thrombus im Modell der LysMCre-iDTR Maus eine verbesserte Auflösung als in der Kontrollgruppe der LysMCre Maus. In der vorliegenden Arbeit konnte kein genauer Mechanismus beschrieben werden. Das Depletionsregime führte nicht zur gewünschten Reduzierung der Anzahl von Monozyten/Makrophagen im Thrombengewebe,

sondern zu einem gegenteiligen Effekt. Ein Einfluss von apoptotischen Körperchen durch die Induktion der Apoptose bei der Verwendung des Diphterietoxins zur Depletion der myelomonozytären Zellen stellt eine mögliche Ursache dar. Der höhere Anteil an Monozyten im Thrombengewebe der LysMCre-iDTR Maus und der durch MCP-1 hervorgerufene "shift" zum antiinflammatorischen Typ der Immunantwort, was sich auch in der Erhöhung von IL4 widerspiegelte, beeinflussten demnach die Auflösung maßgeblich.

4.4 Apoptotische Zellen in der Zirkulation stimulieren die Entstehung eines venösen Thrombus

Die Verwendung des Diphterietoxin im Modell der LysMCre-iDTR-Maus führte zum Untergang der LysozymM exprimierenden Zellen, welche durch den Prozess der Apoptose abgebaut werden. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, scheint die Depletion monozytärer Zellen die Thrombusbildung in der *Vena cava* zu beeinflussen. Die in der depletierten LysMCre-iDTR Maus entstandenen Thromben stellten sich signifikant größer dar und der Einfluß venöser Seitenäste zeigte bei diesen Tieren keine Relevanz. Eine Untersuchung der Blutproben von behandelten Tieren zum Zeitpunkt der Ligatur ergab einen signifikanten Unterschied an CD45 positiven/Annexin V positiven/7AAD negativen Zellen. Dieses Ergebnis spricht für das vermehrte Auftreten von apoptotischen Zellen in der Zirkulation der behandelten LysMCre-iDTR Tiere.

Frantz et al. (2013) beschrieben das vermehrte Auftreten von intrakardialen Thromben nach einem Myokardinfarkt im Modell der LysMCre-iDTR Maus³⁸. Da es in dieser Studie sowohl bei Verwendung des LysMCre-iDTR Modelles als auch bei der Verwendung von Chlodronat zur Depletion monozytärer Zellen zum vermehrten Auftreten von Thromben kam, könnten die dadurch entstandenen monozytären Mikropartikel eine Erklärung für die verstärkte Thrombusbildung darstellen. Der verminderte Blutfluss führte möglicherweise zu einer Anhäufung dieser Partikel im stenosierte Bereich, was sich auch auf das Endothel auswirken konnte. Aharon et al. (2008) zeigte mit Hilfe einer in vitro Studie, dass gerade monozytäre Mikropartikel in der Lage sind, sich an Endothelzellen anzulagern, von diesen internalisiert werden und dann eine Stimulation der Gen- und Proteinexpression hervorrufen, was sich vor allem in der vermehrten Expression von TF äußert².

4.5 Ein Anstieg von VCAM-1 und MCP-1 im Venengewebe fördert das Entstehen einer Thrombose

VCAM-1 wird ausschließlich nach Zytokinstimulation auf Endothelzellen exprimiert; es zählt zur Immunglobulinsuperfamilie und wird allgemein als Adhäsionsmolekül bezeichnet. Die Expression dieses Moleküls führt zu einer festen Adhäsion von leukozytären Zellen, hauptsächlich Monozyten, an Endothelzellen⁹⁰. Wie eine aktuelle Studie von Mosevoll et al. (2015) zeigte, kommt es bei Patienten mit einer tiefen Beinvenenthrombose zu einem signifikanten Anstieg der Plasmaspiegel von VCAM-1¹⁰³. Die in der vorliegenden Arbeit erhöhten Werte für VCAM-1 in der LysMCre-iDTR Gruppe, sprechen demnach für ein vermehrtes Auftreten venöser Thromben. Da in dieser Versuchsgruppe keine weiteren Gewebe untersucht wurden, kann das Bestehen von Mikrothromben in anderen Geweben vor Ligatur der *Vena cava caudalis* nicht ausgeschlossen werden.

MCP-1 gehört zur CC-Familie der Chemokine, deren Klassifikation auf ihrer primären, von Zysteinresten bestehenden Aminosäurezusammensetzung beruht. Diese Proteine werden vor allem als Antwort auf Entzündungsreize freigesetzt und wirken in erster Linie chemotaktisch⁹⁰. MCP-1 reguliert die Migration und Infiltration von Monozyten, Gedächtniszellen und NK-Zellen, wobei Monozyten/Makrophagen gleichzeitig die hauptsächliche Quelle von MCP-1 darstellen²¹. Eine Ligatur der *Vena cava caudalis* und eine dadurch herbeigeführte Stenose führte bereits nach 6 Stunden zu einem Anstieg von MCP-1¹⁵⁵.

Die Analyse der Venensegmente zeigte, dass zum eigentlichen Zeitpunkt, an dem die Ligatur des Gefäßes erfolgen sollte, auf mRNA-Ebene das Zelladhäsionsmolekül VCAM-1 und MCP-1 signifikant in der behandelten LysMCre-iDTR Maus erhöht waren. Dies bedeutet, dass bereits ein inflammatorisches Geschehen, wahrscheinlich aufgrund der in der Zirkulation befindlichen Mikropartikel, stattfand. Interessanterweise war die Expression von TF im Gefäßabschnitt nicht erhöht, was theoretisch nach der in vitro Studie von Aharon et al. (2008) eine mögliche Erklärung für den prokoagulatorischen Effekt wäre². Da jedoch im Gefäßsegment bereits durch andere stimulative Effekte ein proinflammatorisches Milieu vorhanden war, führte die im weiteren Verlauf durchgeführte Ligatur zu einer deutlich verstärkten Thrombusbildung.

5. Untersuchung der Auswirkung einer Verschiebung zur T_H2-Immunantwort auf den Auflösungsprozess venöser Thromben

5.1 Die Tbx 21 ko Maus zeigt eine verbesserte Auflösung des venösen Thrombus

Proinflammatorische Zytokine und Chemokine spielen nachweislich eine wichtige Rolle im Prozess der Thrombenentstehung und -auflösung^{56, 58, 62, 115, 138}. In diesem Zusammenhang ist Interferon gamma (Ifn γ) als pleiotropes Zytokin, welches die Aktivierung von Makrophagen, die Expression von Chemokinen und allgemein die Rekrutierung von Immunzellen zum Inflammationsherd beeinflusst, vordergründig zu nennen¹³². Bisherige Studien zeigten, dass Ifn γ als Signaturzytokin der T_H1-Immunantwort¹⁴⁴ den Auflösungsprozess eines venösen Thrombus negativ beeinflusste. Auflösungsstudien in der Ifn γ knockout Maus ergaben zu späten Zeitpunkten (nach 10 und 14 Tagen) eine verbesserte Auflösung des Thrombus¹¹⁵. Nicht nur T_H1-Lymphozyten sondern auch NKT-Zellen, NK-Zellen, B-Zellen und Makrophagen sind Produzenten von Ifn γ ^{44, 132}. Beschrieben sind in diesem Zusammenhang auch ein negativer Einfluss von Ifn γ auf die Wundheilung, welcher durch eine verminderte Expression von TGF beta und VEGF hervorgerufen wird⁶⁴. Die Wahl der Tbx 21 ko Maus zur Durchführung einer Auflösungsstudie im Rahmen der vorliegenden Arbeit, beruhte auf der nachweislichen verschobenen T_H2-Immunantwort, die in diesen Tieren vorrangig ausgeprägt ist. Da der Transkriptionsfaktor T-bet ein wichtiger Regulator der Inf γ Produktion ist, konnten die Ergebnisse aus der von Nosaka et al. publizierten Auflösungsstudie aus der Inf γ knockout Maus reproduziert werden¹¹⁵. Die Tbx 21 ko Maus besitzt einen Defekt in der Entwicklung von T_H1-Lymphozyten, was zu einer Überproduktion an T_H2 Zytokinen führt. Zudem beeinflusst T-bet die Reifung von CD4⁺ T-Zellen zu einem T_H1-Phänotyp^{144, 169}. In diesem Zusammenhang kommt es zu einem Anstieg von TGF beta und einer verminderten Expression von Ifn γ ^{118, 144}. Doch nicht nur die veränderten Zytokinmuster, sondern auch eine dementsprechend veränderte Differenzierung der Makrophagenpopulation könnte in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle im Prozess der Thrombenauflösung spielen (Abb. 58)¹⁰⁵.

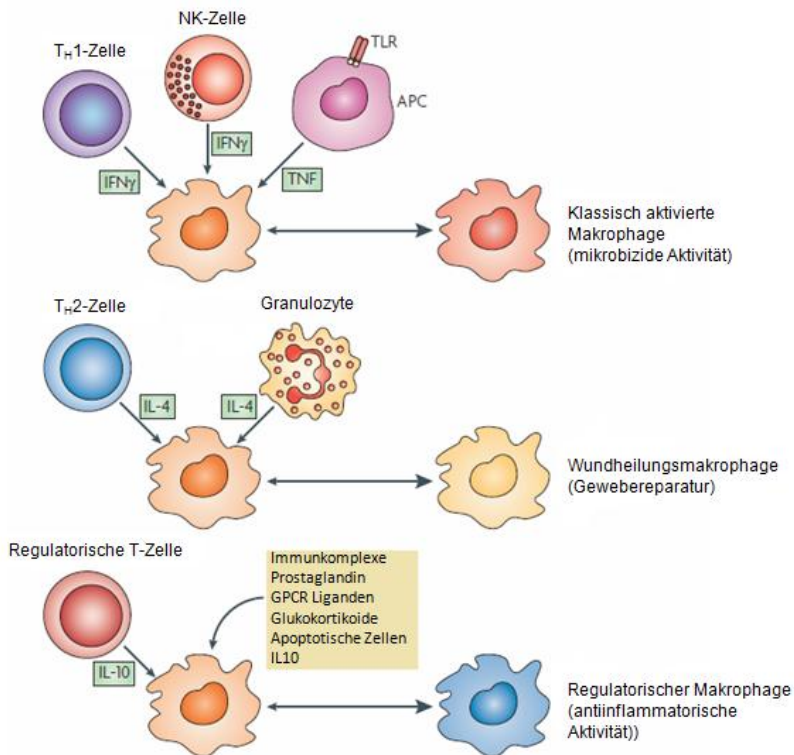


Abbildung 58: Von Immunzellen produzierte Zytokine führen zur Stimulation verschiedener Makrophagenpopulationen (modifiziert nach ¹⁰⁵).

Durch die Einwirkung von Interferon gamma ($IFN\gamma$), produziert von T_H1 -Zellen und Natürlichen Killerzellen (NK), sowie Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), gebildet von Antigen präsentierenden Zellen (APC), entwickeln sich klassisch aktivierte Makrophagen, welche vornehmlich eine mikrobizide Aktivität besitzen. Im Gegensatz dazu führt eine Stimulation durch Interleukin 4 (IL4), vornehmlich gebildet von T_H2 -Zellen und Granulozyten zur Entstehung von alternativ aktivierten Makrophagen, sogenannten Wundheilungsmakrophagen. Regulatorische Makrophagen mit einer antiinflammatorischen Aktivität werden durch verschiedenste Stimuli generiert. Hierzu zählen vor allem die Bildung von Interleukin 10 (IL10), durch regulatorische T-Zellen sowie das Vorhandensein von apoptotischen Zellen, Immunkomplexen, Prostaglandinen, GPCR-Liganden (G-Protein gekoppelte Rezeptoren) und Glukokortikoiden. Diese Zellen führen wiederum durch eine vermehrte Produktion von IL10 zu einer Abschwächung der Inflammation.

5.2 Die Verschiebung zur T_H2-Immunantwort zeigt nur geringe Veränderungen in der zellulären Zusammensetzung vom Thrombengewebe

Eine bedeutende Fragestellung dieser Arbeit war es, ob die Verschiebung zur T_H2-Immunantwort zu einer Veränderung in der Zusammensetzung an inflammatorischen Zellen im Venensegment und im Thrombengewebe führt. Die Untersuchung des Gewebes an Tag 10 und Tag 14, an denen hochsignifikante Unterschiede im Auflösungsprozess der Tbx 21 ko Maus ermittelt wurden, zeigten im Venengewebe keine Veränderung der prozentualen Anteile an untersuchten Zellpopulationen im Vergleich zur Kontrollmaus. Lediglich die im Thrombengewebe vorhandene Population der Ly6C positiven inflammatorischen Monozyten war an Tag 14 in der Tbx 21 ko Maus deutlich erniedrigt. Saha et al. (2011) beschrieben bereits den möglichen Einfluss von Ly6C positiven Zellen im Geschehen der Entstehung und Auflösung venöser Thromben¹²⁶. Die Argumentation dieser Arbeitsgruppe beruhte auf der Tatsache, dass CCR2 essentiell für den Austritt von Ly6C⁺ Zellen aus dem Knochenmark ist¹³⁶ und stützte sich vor allem auf die Erkenntnis einer verschlechterten Auflösung venöser Thromben in der CCR2 ko Maus^{3, 56}. Verglichen mit Studien im Myokardinfarktmodell zeigten sich dort in der frühen Phase hohe Anteile an Ly6C⁺ Zellen im geschädigten Gewebe, wohingegen in der reparativen Phase vermehrt Ly6C⁻ Zellen zu finden waren¹¹¹. Gerade den Ly6C⁻ Zellen wird ein positiver Einfluss auf Gewebereparatur, Kollagenablagerung und Angiogenese zugesprochen¹⁰⁵. Diese Tatsache könnte eine Erklärung für den geringeren Anteil an Ly6C⁺ Zellen im Thrombus der Tbx 21 ko Maus darstellen. Eine frühere Verschiebung in die reparative Phase würde demnach den Auflösungsprozess beschleunigen.

Des Weiteren zeigte sich an Tag 14 eine signifikante Reduktion des prozentualen Anteils an neutrophilen Granulozyten im Thrombengewebe der Tbx 21 ko Maus. Wie bisherige Studien im Stasemodell der Ratte zeigten, führte eine Depletion von neutrophilen Granulozyten zu einer verschlechterten Auflösung venöser Thromben¹⁵¹. Dabei konnten zwei und sieben Tage nach dem Eingriff eine verstärkte Fibrose des Thrombengewebes sowie signifikant niedrigere Konzentrationen an uPA und MMP9 detektiert werden¹⁵⁰. Dieser Sachverhalt wurde jedoch bisher noch nicht im Mausmodell gezeigt¹²⁶. Dahingehend ist die Rolle von neutrophilen Granulozyten bisher weitreichend ungeklärt. Ein negativer Einfluss durch Abwesenheit neutrophiler

Granulozyten auf die im Thrombus stattfindende Angiogenese, bedingt durch eine verminderte VEGF Produktion dieser Zellen⁸⁹, erklärt vor allem die im Stasemodell der Ratte gewonnenen Ergebnisse. Da in der vorliegenden Arbeit eine verbesserte Auflösung venösen Thrombenmaterials dargestellt werden konnte, ist die Abnahme des prozentualen Anteils an neutrophilen Granulozyten möglicherweise ein Effekt des vorangeschrittenen Auflösungsprozesses und der bereits im Thrombengewebe vorhandenen erhöhten Konzentrationen an VEGF.

Zusammenfassend ergaben sich nur im Thrombengewebe signifikante Veränderungen in der Zellzusammensetzung, das Venensegment als aktive Barriere blieb unbeeinträchtigt.

5.3 Die Zytokinmuster in der Tbx 21 ko Maus zeigen einen vermehrt antiinflammatorischen Phänotyp

Experimente in der Tbx 21 ko Maus zeigten im Zusammenhang mit der Kontrolle von inflammatorischen Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen³⁴ eine Verschiebung zur T_H2-Immunantwort, welche sich vor allem durch die Expression von antiinflammatorischen Zytokinmustern auszeichnete¹⁶⁵. In diesem Fall hervorzuheben ist TGF beta, ein Zytokin mit Einfluss auf hämatopoetische Zellen, welches vor allem in inflammatorische Regulationsprozesse involviert ist. Dabei besitzt es pleiotrope Effekte auf Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Zellmigration, Fibrose, Wundheilung und allgemeine Immunantworten⁴⁵. Im Rahmen der Wundheilung beeinflusst TGF beta vorwiegend die Freisetzung von Kollagen aus Fibroblasten und stellt demnach ein Schlüsselmediator der Kollagensynthese dar^{64, 80}. Im Zusammenhang mit M2 Makrophagen scheint TGF beta eine wichtige Rolle zu spielen; es wird von diesen Zellen endogen gebildet und führt zu einer starken Inhibierung der NO-Produktion^{94, 154}. M2 Makrophagen produzieren vermehrt Ornithin, welches Proliferations- und Reparatonsprozesse durch die Bildung von Polyaminen und Kollagen unterstützt^{95, 102}. Auch die Phagozytose apoptotischer Zellen führt in Makrophagen zu einer TGF beta Sekretion, was sich inhibitorisch auf die Produktion spezifischer inflammatorischer Zytokine und Chemokine auswirkt, vor allem IL1 beta, TNF alpha, GM-CSF und IL8³⁷. In der vorliegenden Arbeit zeigte die Tbx 21 ko Maus im Auflösungsprozess venöser Thromben an Tag 2, 10 und 14 nach Ligatur deutlich erhöhte Werte an TGF beta im Venengewebe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis spiegelte das bereits beschriebene phänotypische

Merkmal dieses Mausstammes wider^{116, 142}. Im Thrombenmaterial konnte lediglich ein tendenzieller Anstieg von TGF beta über den Zeitraum von 14 Tagen gemessen werden. Dieses Resultat spricht demnach nicht für eine verstärkte Kollagenbildung im Thrombengewebe, was sich im Verlauf auf den Auflösungsprozess positiv auswirkte. Der Abbau von Kollagen ist besonders im Auflösungsprozess eines venösen Thrombus von Bedeutung. Madsen et al. (2013) beschrieben in diesem Zusammenhang M2-Makrophagen als wichtige Zellpopulation⁸⁸. Eine erhöhte Expression von TGF beta im Venengewebe der Tbx 21 ko Maus könnte demnach ein Indiz zur Anreicherung des Venengewebes mit M2-Makrophagen darstellen und den Kollagenabbau über diese aktive Barriere steuern.

Im Falle der Antigenpräsentation durch Makrophagen inhibiert TGF beta das inflammatorische Zytokin IL12-p40, was zu Blockierung der antigenpräsentierenden Funktion von Makrophagen führt. Das heterodimere Protein IL12 besteht aus der p35 und p40 Untereinheit. Die hauptsächliche Produktion erfolgt in Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen. IL12 führt zu einer Stimulation der Produktion von $\text{Ifn}\gamma$ in NK-Zellen und T-Zellen und spielt eine wichtige Rolle in der Differenzierung von $\text{T}_{\text{H}}1$ -Zellen¹⁵⁸. Innerhalb der Kontrollgruppe stiegen die mRNA Expressionswerte im Venengewebe erst ab Tag 10 deutlich an und nahmen an Tag 14 wieder ab. Im Thrombengewebe ließ sich eine deutliche Zunahme von IL 12 bis Tag 14 in der Kontrollgruppe darstellen. Dieses Ergebnis korreliert mit dem von Nosaka et al. (2011) publizierten mRNA Expressionswerten von $\text{Ifn}\gamma$ ¹¹⁵ und ist gleichzeitig ein Indiz für die verringerte Expression von $\text{Ifn}\gamma$ in der Tbx 21 ko Maus.

Im Gegensatz zu IL12 stellt IL10 eines der wichtigsten antiinflammatorischen Zytokine zusammen mit TGF beta dar⁴⁸. Die hauptsächliche Quelle für IL10 sind $\text{T}_{\text{H}}2$ -Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen, aber auch neutrophile Granulozyten, Mastzellen und epitheliale Zellen²⁸. Die Produktion von IL10 hat eine Inhibierung der Bildung von proinflammatorischen Zytokinen zur Folge. In diesem Zusammenhang zu nennen ist ein Einfluss auf IL1, TNF und IL6. Downing et al. (1997) zeigten einen Einfluss von IL10 auf die Infiltration von inflammatorischen Zellen ins Venengewebe. Die von dieser Arbeitsgruppe publizierten Daten zeigten bei Depletion dieses Zytokins eine gesteigerte Infiltration von neutrophilen Granulozyten ins Venengewebe und eine zusätzliche intravenöse Verabreichung von rekombinatem

IL10 resultierte in verringerten Thrombengewichten²⁸. In der vorliegenden Arbeit ermittelte mRNA Expressionswerte zeigten im Venengewebe der Tbx 21 ko Maus schon zwei Tage nach Ligatur der *Vena cava caudalis* einen deutlichen Anstieg von IL10 der aber im weiteren Verlauf der Untersuchung wieder deutlich abfiel. Auch in der Kontrollgruppe war ein Anstieg von IL10 zu verzeichnen, jedoch waren die Werte hier geringer als in der Tbx 21 ko Maus. Im Thrombengewebe war keine Unterschied zwischen beiden Gruppen darstellbar. Mit diesem Ergebnis zeigte sich eine deutliche Verschiebung in den antiinflammatorischen Prozess der sich im weiteren Verlauf der Auflösung des Thrombus scheinbar positiv auswirkte, obwohl eine erhöhte Expression von IL10 nur in der Vene darstellbar war. Da gerade im Thrombengewebe ein geringerer Anteil an neutrophilen Granulozyten in der Tbx 21 ko Maus im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, scheint die verstärkte Expression von IL10 im Venengewebe möglicherweise eine zusätzliche Infiltration von neutrophilen Granulozyten in das Thrombengewebe zu verhindern.

Bisher wurden keine Zusammenhänge zwischen Interleukin 33 (IL33) und venöser Thrombose beschrieben. Jedoch zeigten mehrere Studien protektive Effekte von IL33 im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen, wie Arteriosklerose und Hypertonie^{93, 129}. IL33 gehört zur Interleukin 1 Superfamilie und wird hauptsächlich von Fibroblasten, Mastzellen, dendritischen Zellen, Makrophagen, endothelialen und epithelialen Zellen gebildet⁹⁷. Im Allgemeinen fördert es die Produktion von T_H2 assoziierten Zytokinen und ist involviert an der Differenzierung von M2 Makrophagen^{73, 92}. In der vorliegenden Arbeit ermittelte mRNA Expressionswerte zeigten einen deutlichen Anstieg von IL33 im Venengewebe bereits zwei Tage nach Ligatur. Im Thrombengewebe hingegen waren keine Unterschiede der Expression darstellbar. Da das Zytokinmuster im Venengewebe der Tbx 21 ko Maus eine deutliche Verschiebung zur T_H2-Immunantwort zeigte, ist die vermehrte Bildung bzw. Ansammlung von M2-Makrophagen somit indirekt nachweisbar. Damit stellt das Venengewebe als aktive Barriere eine entscheidende Vermittlerfunktion im Prozess der Auflösung venöser Thromben im Mausmodell dar.

Ein weiteres Zytokin, welches die Entwicklung von M2 Makrophagen beeinflusst, ist IL4. Dieses als multifunktionales, pleiotrop beschriebenes Zytokin, welches einen T_H2 Phänotyp induziert, fördert auch die Differenzierung von M2-Makrophagen⁸⁵. Die

hauptsächliche Quelle stellen zudem T_H2-Lymphozyten dar. Im Vergleich zu anderen antiinflammatorischen Zytokinen zeigte sich IL4 im Thrombengewebe deutlich erhöht in der Tbx 21 ko Gruppe lediglich zwei Tage nach Ligatur der Tiere. Zu späteren Zeitpunkten war die Expression nicht mehr nachweisbar. Diese Tatsache spricht für eine Verschiebung zur Bildung von M2-Makrophagen und einem reparativen Einfluss auf das Thrombengewebe.

Wie zuvor schon im Abschnitt 4 beschrieben, zeigte MCP-1 einen Einfluss auf die T-Zellimmunität und deutete auf die Entwicklung einer T_H2-Immunantwort hin²¹. Im Thrombengewebe der Tbx 21 ko Maus war demnach ein deutlicher Anstieg zwei Tage nach Ligatur darstellbar. Waltham et al. (2000) publizierten erstmals Daten zum Vorhandensein von VEGF im sich auflösenden venösen Thrombengewebe¹⁵⁷. Dieses Protein, welches als Signalmolekül fungiert, ist ein hauptsächlicher Regulator der Angiogenese. Erhöhte Werte zeigen sich vor allem in der Wundheilung, bei der ischämischen Revaskularisierung und auch im Tumorwachstum¹⁵⁷. Nach Waltham et al. kommt es im Thrombengewebe zu einem stetigen Anstieg von VEGF mit den Höchstwerten der Proteinkonzentrationen um Tag 14 bis 21. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigte sich im Thrombengewebe der Tbx 21 ko Gruppe eine signifikante Zunahme der mRNA Expression für VEGF. Diese Daten sprechen für eine verbesserte Angiogenese im Thrombengewebe der Tbx 21 ko Maus, was eine verbesserte Rekanalisation des Thrombengewebes zur Folge hat und somit den Abbauprozess beschleunigt. Außerdem erklärt dieses Ergebnis die verringerte Nachweisbarkeit von neutrophilen Granulozyten im Thrombengewebe der Tbx 21 ko Maus.

Zusammenfassend zeigte die Defizienz des Transkriptionsfaktors T-bet und der daraus resultierende T_H2-Phänotyp ein bevorzugt antiinflammatorisches Milieu im Venen- und Thrombengewebe. Es ließ sich eine deutliche Verschiebung zur T_H2-Immunantwort auf mRNA Ebene darstellen. Allgemein zeigte diese Verschiebung einen positiven Einfluss auf den Auflösungsprozess eines venösen Thrombus. Um detaillierte Informationen zu gewinnen ist eine histologische Analyse von Vene und Thrombus unabdingbar, in erster Linie, um einen Überblick über den Grad der Fibrosierung und den prozentualen Anteil an Kollagen zu definieren. Des Weiteren könnte die Analyse der fibrinolytischen Aktivität im Thrombengewebe mehr

Informationen über den Abbauprozess beinhalten. Auch in der venösen Thrombose scheint die Differenzierung von M2 Makrophagen positive reparative Effekte zu besitzen, ein weiterer Fokus auf das Enzym Arginase könnte dahingehend weitere Aspekte hervorheben.

6. Auswirkung auf die Bildung eines venösen Thrombus in Abwesenheit von CD4 positiven Zellen

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass nach Induzierung einer venösen Thrombose im Mausmodell auch TCR beta positive T-Zellen in der Venenwand und in geringen Mengen auch im gebildeten Thrombus zu finden sind. Vor allem im Thrombengewebe war der Anteil an CD4 positiven Zellen einen Tag nach Entstehung am höchsten mit im weiteren Verlauf sich verringenden Werten. In der Vene hingegen stieg die Anzahl dieser Zellen bis Tag 10 an, um danach allmählich wieder zu sinken. Bisher gibt es nicht viele Daten zum Einfluss von T-Zellen im Entstehungsprozess venöser Thromben. So demonstrierte die Verwendung der SCID Maus keinen Unterschied in der Bildung eines venösen Thrombus im Vergleich zur Kontrollgruppe⁶¹. Bei AIDS-Patienten wurde eine signifikant negative Korrelation zwischen der Anzahl an CD4 positiven Zellen und dem Auftreten von thrombotischen Erkrankungen beschrieben¹²⁷. Studien im Bereich der Arteriosklerose zeigten einen deutlichen Einfluss von CD4 positiven Zellen. So führte eine zusätzliche Anreicherung dieser Zellen zu einem verschlimmerten Krankheitsbild¹⁶⁷ und die CD4 Zell Defizienz zur einer schwächeren Ausprägung¹⁶⁸. Inflammatorische Prozesse besitzen zumeist einen T_H1-Phänotyp, somit könnte der Wegfall der Differenzierungsmöglichkeit einer naiven CD4 Zelle zu einer T_H1 Zelle ausschlaggebend für die Entstehung eines venösen Thrombus sein. Auch Blutplättchen sind in der Lage IL1 beta zu bilden und somit die Differenzierung von naiven CD4 Zellen zu T_H1 Zellen zu fördern⁵³. Einen Einfluss auf die Entstehung einer venösen Thrombose wäre somit denkbar.

In der vorliegenden Arbeit zeigten sich 24 Stunden nach Ligatur nur geringe Unterschiede in Thrombengröße und -gewicht zwischen der Gruppe der CD4 depletierten Tiere und der C57BL/6 Kontrollgruppe. Eine deutliche Depletion im Venengewebe und im Thrombengewebe der CD4 positiven Zellen war darstellbar. Im

Thrombengewebe zeigte sich eine signifikante Reduktion an Monozyten in der Gruppe der depletierten Tiere. Die Verringerung des prozentualen Anteils an Monozyten ist wahrscheinlich auf die Tatsache zurückzuführen, dass auch Monozyten in der Lage sind den CD4 Rezeptor zu exprimieren¹⁴⁶. Dennoch wäre ein Einfluss auf die Thrombusbildung durch eine verringerte Thromboplastinproduktion denkbar und erklärt die tendenziell niedrigeren Thrombusmesswerte in der CD4 depletierten Gruppe. Da aber gerade $\text{I}\text{f}\text{n}\gamma$ als inflammatorisches Zytokin erst im späteren Verlauf einer venösen Thrombose in den Vordergrund rückt ist der Wegfall der Zytokinproduzierenden Zellen im Entstehungsstadium ein eher untergeordneter Stimulus. Vor allem in Anbetracht der Tatsache, dass andere Leukozytenpopulationen im Entstehungsprozess eine größere Rolle zu spielen scheinen. Weit interessanter wäre in diesem Zusammenhang den Einfluss der Depletion auf die Thrombenauflösung näher zu betrachten. Die dadurch veränderten Zytokinmuster könnten neue Erkenntnisse zum Einfluss anderer Zellpopulationen hervorbringen und neue mechanistische Wege im Auflösungsprozess darstellen. Nicht nur $\text{T}_{\text{H}}1$ -Zellen sondern auch NKT-Zellen sind in der Lage $\text{I}\text{f}\text{n}\gamma$ zu bilden⁴⁴ und wie sich in der vorliegenden Arbeit zeigte stieg auch der prozentuale Anteil dieser Zellen im Verlauf des Auflösungsprozesses an.

Fasst man die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zusammen, so ergeben sich neue Fragestellungen im Zusammenhang des Einflusses inflammatorischer Zellen auf die Entstehung und Auflösung einer venösen Thrombose. Wie vor allem die Ergebnisse der Tbx 21 ko Maus zeigen ist nicht zwingend eine Veränderung des Anteils an beteiligten Zellen ausschlaggebend, sondern vermehrt die Zytokinproduktion und die damit verbundenen antiinflammatorischen Eigenschaften.

VII. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Auswirkungen einer Depletion von Lysozym M positiven Zellen und der Verschiebung zu einer T_H2-Immunität auf den Entstehungs- und Auflösungsprozess einer venösen Thrombose im Mausmodell untersucht. Vorangehend wurde die Ultraschalluntersuchung der *Vena cava caudalis* und die Aufarbeitung von Thrombusmaterial und Venengewebe etabliert.

In einer auf Ultraschalluntersuchungen basierenden Longitudinalstudie zum Auflösungsprozess venöser Thromben zeigten die LysMCre-iDTR Mäuse, welche einem kontinuierlichen Regime zur Depletion Lysozym M positiver Zellen unterzogen wurde, eine deutlich bessere Auflösung verglichen mit der LysMCre Kontrolle. Diese Feststellung korrelierte mit einem durchflusszytometrisch ermittelten erhöhten Anteil an CD11b⁺/GR1⁻ Zellen, sowie einem Anstieg der CCL 2 mRNA Expression im Thrombengewebe. Paradoxerweise förderte die Depletion LysM positiver Zellen die Entstehung größerer und schwererer Thromben im frühen Stadium nach Induktion einer tiefen Venenthrombose im Mausmodell. Dieses Phänomen war gekoppelt mit dem Auftreten von prothrombotisch wirksamen Annexin V positiven apoptotischen Leukozyten in der Zirkulation, welche die vermehrte Expression von Zelladhäsionsmolekülen in der Venenwand zum eigentlichen Zeitpunkt der Ligation beeinflussen. Bisherige Studien zeigten, dass Tbet defiziente Mäuse auf Grund ihres antiinflammatorischen monozytären Phänotyps und einer verminderten T_H1-Immunantwort vor vaskulärer Dysfunktion geschützt sind. Verglichen mit Wildtyp-Mäusen zeigten Tbx 21 ko Mäuse eine verbesserte Auflösung von thrombotischem Material an Tag 10 und 14 nach Induzierung einer venösen Thrombose. Parallel hierzu zeigte sich ein verminderter prozentualer Anteil an Ly6C positiven Monozyten im Thrombengewebe an Tag 14. Eine deutliche Verschiebung zu T_H2-Immunantwort war sowohl im Thrombengewebe als auch im Venengewebe auf mRNA-Ebene darstellbar.

Inflammatorische Monozyten beeinflussen den Prozess der Thrombenentstehung und Thrombenauflösung. Eine Depletion dieser Zellen im frühen Stadium der Bildung fördert paradoxerweise die Bildung von venösen Thromben im Mausmodell, aber die Depletion über einen längeren Zeitpunkt führt zur schnelleren Auflösung von thrombotischem Material. Die Daten welche im Rahmen dieser Arbeit generiert wurden, zeigten die Verschiebung zu einem reparativen Phänotyp in der Tbx 21 ko

Maus, was eine Verschiebung von M1- zu M2-Makrophagen zu Folge hat und die Thrombenauflösung verbessert.

Eine Abschwächung der entzündlichen Immunantwort könnte somit einen guten Ansatz für die unterstützende Therapie einer tiefen Venenthrombose darstellen.

VIII. Summary

The aim of this study was to determine how depletion of lysozyme positive (LysM+) cells and a switched off TH1 type immune response can influence thrombus formation and resolution in a mouse model of deep vein thrombosis. Previous ultrasound examination of the inferior vena cava and the processing of thrombus and vein tissue for flow cytometry was established.

Compared to LysMCre controls, transgenic LysMCre-iDTR mice that underwent a continued protocol to deplete LysM+ cells showed an improved thrombus resolution as assessed by longitudinal vascular ultrasound studies. This finding correlated with increased number of CD11b⁺/Gr1⁻ cells assessed by flow cytometry and an increase in CCL 2 mRNA expression in thrombotic material. Paradoxically, depletion of LysM+ cells significantly increased thrombus size and weight early after DVT induction. Mechanistically, this phenomenon was linked to an increase of prothrombotic Annexin V positive apoptotic leukocytes in the circulation. Due to this apoptotic bodies, an increase of cell adhesion molecules in the vascular wall is detectable, at timepoint of ligation.

Since T-bet deficient mice are protected from vascular dysfunction due to an anti-inflammatory monocyte phenotype and an attenuated Th1 type immune response, we subjected Tbx 21 ko and WT mice to VCI ligation. Compared to wildtype mice, T-bet^{-/-} mice showed a faster thrombus resolution on day 10 and 14 after thrombus induction, paralleled by a reduction of proinflammatory Ly6C high monocytes in thrombus material on day 14. A clear shift to T_H2 type immune response was represented both in thrombus material as well as in venous tissue at the mRNA level.

Inflammatory monocytes are involved in the thrombus formation and resolution process. Depletion of these cells in early stages paradoxically increases thrombus formation, but over time the depletion leads to a faster resolving of thrombus material. Our data indicate that the reparative phenotype in the Tbx 21 ko mouse shifts M1-type to M2-type macrophages and improves thrombus resolution.

Thereby, ameliorating an inflammatory immune response might by an attractive approach to improve therapy of DVT.

IX. Literaturverzeichnis

- 1 M. N. Aghourian, C. A. Lemarie, and M. D. Blostein, 'In Vivo Monitoring of Venous Thrombosis in Mice', *J Thromb Haemost*, 10 (2012) , 447-52.
- 2 A. Aharon, T. Tamari, and B. Brenner, 'Monocyte-Derived Microparticles and Exosomes Induce Procoagulant and Apoptotic Effects on Endothelial Cells', *Thromb Haemost*, 100 (2008) , 878-85.
- 3 T. Ali, J. Humphries, K. Burnand, B. Sawyer, C. Bursill, K. Channon, D. Greaves, B. Rollins, I. F. Charo, and A. Smith, 'Monocyte Recruitment in Venous Thrombus Resolution', *J Vasc Surg*, 43 (2006) , 601-8.
- 4 G. Aue, J. Nelson Lozier, X. Tian, A. M. Cullinane, S. Soto, L. Samsel, P. McCoy, and A. Wiestner, 'Inflammation, Tnfalpha and Endothelial Dysfunction Link Lenalidomide to Venous Thrombosis in Chronic Lymphocytic Leukemia', *Am J Hematol*, 86 (2011) , 835-40.
- 5 C. N. Bagot, and R. Arya, 'Virchow and His Triad: A Question of Attribution', *Br J Haematol*, 143 (2008) , 180-90.
- 6 J. F. Baldwin, V. Sood, M. A. Elflin, C. E. Luke, N. A. Dewyer, J. A. Diaz, D. D. Myers, T. Wakefield, and P. K. Henke, 'The Role of Urokinase Plasminogen Activator and Plasmin Activator Inhibitor-1 on Vein Wall Remodeling in Experimental Deep Vein Thrombosis', *J Vasc Surg*, 56 (2012) , 1089-97.
- 7 A. Bendelac, P. B. Savage, and L. Teyton, 'The Biology of Nkt Cells', *Annu Rev Immunol*, 25 (2007) , 297-336.
- 8 S. K. Biswas, and A. Mantovani, 'Macrophage Plasticity and Interaction with Lymphocyte Subsets: Cancer as a Paradigm', *Nat Immunol*, 11 (2010) , 889-96.
- 9 I. Bohm, and H. Schild, 'Apoptosis: The Complex Scenario for a Silent Cell Death', *Mol Imaging Biol*, 5 (2003) , 2-14.
- 10 M. Bosma, W. Schuler, and G. Bosma, 'The Scid Mouse Mutant', *Curr Top Microbiol Immunol*, 137 (1988) , 197-202.
- 11 M. Brandt, T. Schonfelder, M. Schwenk, C. Becker, S. Jackel, C. Reinhardt, K. Stark, S. Massberg, T. Munzel, M. L. von Bruhl, and P. Wenzel, 'Deep Vein Thrombus Formation Induced by Flow Reduction in Mice Is Determined by Venous Side Branches', *Clin Hemorheol Microcirc*, 56 (2014) , 145-52.
- 12 A. Brill, T. A. Fuchs, A. S. Savchenko, G. M. Thomas, K. Martinod, S. F. De Meyer, A. A. Bhandari, and D. D. Wagner, 'Neutrophil Extracellular Traps Promote Deep Vein Thrombosis in Mice', *J Thromb Haemost*, 10 (2012) , 136-44.

- 13 T. Buch, F. L. Heppner, C. Tertilt, T. J. Heinen, M. Kremer, F. T. Wunderlich, S. Jung, and A. Waisman, 'A Cre-Inducible Diphtheria Toxin Receptor Mediates Cell Lineage Ablation after Toxin Administration', *Nat Methods*, 2 (2005) , 419-26.
- 14 M. Y. Chan, F. Andreotti, and R. C. Becker, 'Hypercoagulable States in Cardiovascular Disease', *Circulation*, 118 (2008) , 2286-97.
- 15 O. A. Chow, M. von Kockritz-Blickwede, A. T. Bright, M. E. Hensler, A. S. Zinkernagel, A. L. Cogen, R. L. Gallo, M. Monestier, Y. Wang, C. K. Glass, and V. Nizet, 'Statins Enhance Formation of Phagocyte Extracellular Traps', *Cell Host Microbe*, 8 (2010) , 445-54.
- 16 B. E. Clausen, C. Burkhardt, W. Reith, R. Renkawitz, and I. Forster, 'Conditional Gene Targeting in Macrophages and Granulocytes Using Lysmc^{-/-} Mice', *Transgenic Res*, 8 (1999) , 265-77.
- 17 B. C. Cooley, 'In Vivo Fluorescence Imaging of Large-Vessel Thrombosis in Mice', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31 (2011) , 1351-6.
- 18 T. Cukierman, M. E. Gatt, D. Libster, N. Goldschmidt, and Y. Matzner, 'Chronic Lymphocytic Leukemia Presenting with Extreme Hyperleukocytosis and Thrombosis of the Common Femoral Vein', *Leuk Lymphoma*, 43 (2002) , 1865-8.
- 19 S. Dahi, J. G. Lee, D. H. Lovett, and R. Sarkar, 'Differential Transcriptional Activation of Matrix Metalloproteinase-2 and Membrane Type-1 Matrix Metalloproteinase by Experimental Deep Venous Thrombosis and Thrombin', *J Vasc Surg*, 42 (2005) , 539-45.
- 20 S. M. Day, J. L. Reeve, D. D. Myers, and W. P. Fay, 'Murine Thrombosis Models', *Thromb Haemost*, 92 (2004) , 486-94.
- 21 S. L. Deshmane, S. Kremlev, S. Amini, and B. E. Sawaya, 'Monocyte Chemoattractant Protein-1 (Mcp-1) : An Overview', *J Interferon Cytokine Res*, 29 (2009) , 313-26.
- 22 N. A. Dewyer, V. Sood, E. M. Lynch, C. E. Luke, G. R. Upchurch, Jr., T. W. Wakefield, S. Kunkel, and P. K. Henke, 'Plasmin Inhibition Increases Mmp-9 Activity and Decreases Vein Wall Stiffness During Venous Thrombosis Resolution', *J Surg Res*, 142 (2007) , 357-63.
- 23 J. A. Diaz, D. M. Farris, S. K. Wroblewski, D. D. Myers, and T. W. Wakefield, 'Inferior Vena Cava Branch Variations in C57bl/6 Mice Have an Impact on Thrombus Size in an Ivc Ligation (Stasis) Model', *J Thromb Haemost*, 13 (2015) , 660-4.
- 24 J. A. Diaz, A. E. Hawley, C. M. Alvarado, A. M. Berguer, N. K. Baker, S. K. Wroblewski, T. W. Wakefield, B. R. Lucchesi, and D. D. Myers, Jr., 'Thrombogenesis with Continuous Blood Flow in the Inferior Vena Cava. A Novel Mouse Model', *Thromb Haemost*, 104 (2010) , 366-75.

- 25 J. A. Diaz, A. T. Obi, D. D. Myers, Jr., S. K. Wroblewski, P. K. Henke, N. Mackman, and T. W. Wakefield, 'Critical Review of Mouse Models of Venous Thrombosis', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32 (2012) , 556-62.
- 26 J. A. Diaz, S. K. Wroblewski, A. E. Hawley, B. R. Lucchesi, T. W. Wakefield, and D. D. Myers, Jr., 'Electrolytic Inferior Vena Cava Model (Eim) of Venous Thrombosis', *J Vis Exp* (2011) , e2737.
- 27 C. Diehm, F. Stammler, and K. Amendt, 'Tiefe Venenthrombose/ Diagnostik Und Therapie', *Deutsches Ärzteblatt*, 94 (1997) , 301 · 11.
- 28 L. J. Downing, R. M. Strieter, A. M. Kadell, C. A. Wilke, J. C. Austin, B. D. Hare, M. D. Burdick, L. J. Greenfield, and T. W. Wakefield, 'Il-10 Regulates Thrombus-Induced Vein Wall Inflammation and Thrombosis', *J Immunol*, 161 (1998) , 1471-6.
- 29 C. E. Egan, W. Sukhumavasi, A. L. Bierly, and E. Y. Denkers, 'Understanding the Multiple Functions of Gr-1(+) Cell Subpopulations During Microbial Infection', *Immunol Res*, 40 (2008) , 35-48.
- 30 M. R. Elstad, T. R. La Pine, F. S. Cowley, R. P. McEver, T. M. McIntyre, S. M. Prescott, and G. A. Zimmerman, 'P-Selectin Regulates Platelet-Activating Factor Synthesis and Phagocytosis by Monocytes', *J Immunol*, 155 (1995) , 2109-22.
- 31 W. Engelhardt, and G. Breves, *Physiologie Der Haustiere*. Vol. 1 (Enke Verlag Stuttgart, 2000) , p. 682.
- 32 M. J. Eppihimer, and R. G. Schaub, 'P-Selectin-Dependent Inhibition of Thrombosis During Venous Stasis', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20 (2000) , 2483-8.
- 33 W. Erhardt, P. Kölle, and J. Henke, *Anästhesie Und Analgesie Beim Klein- Und Heimtier*. Vol. 2 (Schattauer GmbH, Stuttgart, 2012) , p. 1000.
- 34 J. H. Esensten, M. R. Lee, L. H. Glimcher, and J. A. Bluestone, 'T-Bet-Deficient Nod Mice Are Protected from Diabetes Due to Defects in Both T Cell and Innate Immune System Function', *J Immunol*, 183 (2009) , 75-82.
- 35 C. E. Evans, J. Humphries, P. Saha, and A. Smith, 'Opinions on Mouse Models of Thrombosis', *Thromb Res*, 130 (2012) , 285-6.
- 36 D. H. Evans, and N. W. McDicken, *Doppler Ultrasound · Physics, Instrumental, and Clinical Applications*. Vol. 2 (Wiley, 2000) , p. 456.
- 37 V. A. Fadok, D. L. Bratton, A. Konowal, P. W. Freed, J. Y. Westcott, and P. M. Henson, 'Macrophages That Have Ingested Apoptotic Cells in Vitro Inhibit Proinflammatory Cytokine Production through Autocrine/Paracrine Mechanisms Involving Tgf-Beta, Pge2, and Paf', *J Clin Invest*, 101 (1998) , 890-8.
- 38 S. Frantz, U. Hofmann, D. Fraccarollo, A. Schafer, S. Kranepuhl, I. Hagedorn, B. Nieswandt, M. Nahrendorf, H. Wagner, B. Bayer, C. Pachel, M. P. Schon, S. Kneitz, T. Bobinger, F. Weidemann, G. Ertl, and J. Bauersachs, 'Monocytes/Macrophages

- Prevent Healing Defects and Left Ventricular Thrombus Formation after Myocardial Infarction', *FASEB J*, 27 (2013) , 871-81.
- 39 T. A. Fuchs, A. A. Bhandari, and D. D. Wagner, 'Histones Induce Rapid and Profound Thrombocytopenia in Mice', *Blood*, 118 (2011) , 3708-14.
- 40 T. A. Fuchs, A. Brill, D. Duerschmied, D. Schatzberg, M. Monestier, D. D. Myers, Jr., S. K. Wroblewski, T. W. Wakefield, J. H. Hartwig, and D. D. Wagner, 'Extracellular DNA Traps Promote Thrombosis', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (2010) , 15880-5.
- 41 F. Geissmann, S. Jung, and D. R. Littman, 'Blood Monocytes Consist of Two Principal Subsets with Distinct Migratory Properties', *Immunity*, 19 (2003) , 71-82.
- 42 R. N. Germain, and I. Stefanova, 'The Dynamics of T Cell Receptor Signaling: Complex Orchestration and the Key Roles of Tempo and Cooperation', *Annu Rev Immunol*, 17 (1999) , 467-522.
- 43 P. L. Giesen, U. Rauch, B. Bohrmann, D. Kling, M. Roque, J. T. Fallon, J. J. Badimon, J. Himber, M. A. Riederer, and Y. Nemerson, 'Blood-Borne Tissue Factor: Another View of Thrombosis', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (1999) , 2311-5.
- 44 D. I. Godfrey, K. J. Hammond, L. D. Poulton, M. J. Smyth, and A. G. Baxter, 'Nkt Cells: Facts, Functions and Fallacies', *Immunol Today*, 21 (2000) , 573-83.
- 45 K. J. Gordon, and G. C. Blobel, 'Role of Transforming Growth Factor- β Superfamily Signaling Pathways in Human Disease', *Biochim Biophys Acta*, 1782 (2008) , 197-228.
- 46 S. Gordon, and P. R. Taylor, 'Monocyte and Macrophage Heterogeneity', *Nat Rev Immunol*, 5 (2005) , 953-64.
- 47 I. Goren, N. Allmann, N. Yogev, C. Schurmann, A. Linke, M. Holdener, A. Waisman, J. Pfeilschifter, and S. Frank, 'A Transgenic Mouse Model of Inducible Macrophage Depletion: Effects of Diphtheria Toxin-Driven Lysozyme M-Specific Cell Lineage Ablation on Wound Inflammatory, Angiogenic, and Contractive Processes', *Am J Pathol*, 175 (2009) , 132-47.
- 48 G. Grutz, 'New Insights into the Molecular Mechanism of Interleukin-10-Mediated Immunosuppression', *J Leukoc Biol*, 77 (2005) , 3-15.
- 49 GV-SOLAS, 'Tiergerechte Haltung Von Labormäusen', \neg GV-Solas, 2014) , p. 21.
- 50 W. Hach, J.D. Gruss, V. Hach-Wunderle, and M. Jünger, *Venenchirurgie*. Vol. 1 (Stuttgart: Schattauer 2008, 2005) , p. 384.
- 51 D. L. Hamilos, 'Antigen Presenting Cells', *Immunol Res*, 8 (1989) , 98-117.
- 52 B. T. Hayes, M. A. Merrick, M. A. Sandrey, and M. L. Cordova, 'Three-Mhz Ultrasound Heats Deeper into the Tissues Than Originally Theorized', *J Athl Train*, 39 (2004) , 230-34.

-
- 53 K. Hebel, M. Rudolph, B. Kosak, H. D. Chang, J. Butzmann, and M. C. Brunner-Weinzierl, 'II-1beta and Tgf-Beta Act Antagonistically in Induction and Differentially in Propagation of Human Proinflammatory Precursor Cd4+ T Cells', *J Immunol*, 187 (2011) , 5627-35.
- 54 H. J. Hedrich, and G. Bullock, *The Laboratory Mouse* Vol. 1 (Academic Press, 2004) , p. 845.
- 55 P. K. Henke, M. Mitsuya, C. E. Luke, M. A. Elflin, J. F. Baldwin, K. B. Deatrick, J. A. Diaz, V. Sood, G. R. Upchurch, T. W. Wakefield, C. Hogaboam, and S. L. Kunkel, 'Toll-Like Receptor 9 Signaling Is Critical for Early Experimental Deep Vein Thrombosis Resolution', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31 (2011) , 43-9.
- 56 P. K. Henke, C. G. Pearce, D. M. Moaveni, A. J. Moore, E. M. Lynch, C. Longo, M. Varma, N. A. Dewyer, K. B. Deatrick, G. R. Upchurch, Jr., T. W. Wakefield, C. Hogaboam, and S. L. Kunkel, 'Targeted Deletion of Ccr2 Impairs Deep Vein Thrombosis Resolution in a Mouse Model', *J Immunol*, 177 (2006) , 3388-97.
- 57 P. K. Henke, M. R. Varma, D. K. Moaveni, N. A. Dewyer, A. J. Moore, E. M. Lynch, C. Longo, C. B. Deatrick, S. L. Kunkel, G. R. Upchurch, Jr., and T. W. Wakefield, 'Fibrotic Injury after Experimental Deep Vein Thrombosis Is Determined by the Mechanism of Thrombogenesis', *Thromb Haemost*, 98 (2007) , 1045-55.
- 58 P. K. Henke, and T. Wakefield, 'Thrombus Resolution and Vein Wall Injury: Dependence on Chemokines and Leukocytes', *Thromb Res*, 123 Suppl 4 (2009) , S72-8.
- 59 G. A. Hish, Jr., J. A. Diaz, A. E. Hawley, D. D. Myers, Jr., and P. A. Lester, 'Effects of Analgesic Use on Inflammation and Hematology in a Murine Model of Venous Thrombosis', *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 53 (2014) , 485-93.
- 60 J. Huggett, K. Dheda, S. Bustin, and A. Zumla, 'Real-Time Rt-Pcr Normalisation; Strategies and Considerations', *Genes Immun*, 6 (2005) , 279-84.
- 61 J. Humphries, J. A. Gossage, B. Modarai, K. G. Burnand, T. H. Sisson, C. Murdoch, and A. Smith, 'Monocyte Urokinase-Type Plasminogen Activator up-Regulation Reduces Thrombus Size in a Model of Venous Thrombosis', *J Vasc Surg*, 50 (2009) , 1127-34.
- 62 J. Humphries, C. L. McGuinness, A. Smith, M. Waltham, R. Poston, and K. G. Burnand, 'Monocyte Chemotactic Protein-1 (Mcp-1) Accelerates the Organization and Resolution of Venous Thrombi', *J Vasc Surg*, 30 (1999) , 894-9.
- 63 M. Hwang, G. Hariri, A. Lyschik, D. E. Hallahan, and A. C. Fleischer, 'Correlation of Quantified Contrast-Enhanced Sonography with in Vivo Tumor Response', *J Ultrasound Med*, 29 (2010) , 597-607.

-
- 64 Y. Ishida, T. Kondo, T. Takayasu, Y. Iwakura, and N. Mukaida, 'The Essential Involvement of Cross-Talk between Ifn-Gamma and Tgf-Beta in the Skin Wound-Healing Process', *J Immunol*, 172 (2004) , 1848-55.
- 65 C.A. Janeway, P. Travers, M. Walport, and M. Shlomchik, *Immunologie* (Spektrum Akademischer Verlag Gmb, Heidelberg, 2002) .
- 66 M. V. Joglekar, J. Ware, J. Xu, M. E. Fitzgerald, and T. K. Gartner, 'Platelets, Glycoprotein Ib-Ix, and Von Willebrand Factor Are Required for Fc ϵ (3) -Induced Occlusive Thrombus Formation in the Inferior Vena Cava of Mice', *Platelets*, 24 (2013) , 205-12.
- 67 E. Joubert ,Huebner, 'Arterien, Venen Und Kapillarnetz', ed. by E. Joubert ,Huebner (www.kardiotechnik.org, 2009) , p. 12.
- 68 H. E. König, and H. G. Liebich, *Anatomie Der Haussäugetiere*. Vol. 3 (Schattauer GmbH, Stuttgart, 2005) , p. 783.
- 69 S. Konstantinides, '[Acute Massive Pumonary Embolism]', *Dtsch Med Wochenschr*, 137 (2012) , 2014-7.
- 70 C. H. Kos, 'Cre/Loxp System for Generating Tissue-Specific Knockout Mouse Models', *Nutr Rev*, 62 (2004) , 243-6.
- 71 S. Kossmann, M. Schwenk, M. Hausding, S. H. Karbach, M. I. Schmidgen, M. Brandt, M. Knorr, H. Hu, S. Kroller-Schon, T. Schonfelder, S. Grabbe, M. Oelze, A. Daiber, T. Munzel, C. Becker, and P. Wenzel, 'Angiotensin Ii-Induced Vascular Dysfunction Depends on Interferon-Gamma-Driven Immune Cell Recruitment and Mutual Activation of Monocytes and Nk-Cells', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 33 (2013) , 1313-9.
- 72 M. Krummel, C. Wulfig, C. Sumen, and M. M. Davis, 'Thirty-Six Views of T-Cell Recognition', *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 355 (2000) , 1071-6.
- 73 M. Kurowska-Stolarska, B. Stolarski, P. Kewin, G. Murphy, C. J. Corrigan, S. Ying, N. Pitman, A. Mirchandani, B. Rana, N. van Rooijen, M. Shepherd, C. McSharry, I. B. McInnes, D. Xu, and F. Y. Liew, 'Il-33 Amplifies the Polarization of Alternatively Activated Macrophages That Contribute to Airway Inflammation', *J Immunol*, 183 (2009) , 6469-77.
- 74 R. Lacroix, and F. Dignat-George, 'Microparticles: New Protagonists in Pericellular and Intravascular Proteolysis', *Semin Thromb Hemost*, 39 (2013) , 33-9.
- 75 R. Lacroix, C. Dubois, A. S. Leroyer, F. Sabatier, and F. Dignat-George, 'Revisited Role of Microparticles in Arterial and Venous Thrombosis', *J Thromb Haemost*, 11 Suppl 1 (2013) , 24-35.

- 76 C. A. Lawson, S. D. Yan, S. F. Yan, H. Liao, Y. S. Zhou, J. Sobel, W. Kiesel, D. M. Stern, and D. J. Pinsky, 'Monocytes and Tissue Factor Promote Thrombosis in a Murine Model of Oxygen Deprivation', *J Clin Invest*, 99 (1997) , 1729-38.
- 77 V. Lazarevic, and L. H. Glimcher, 'T-Bet in Disease', *Nat Immunol*, 12 (2011) , 597-606.
- 78 V. Lazarevic, L. H. Glimcher, and G. M. Lord, 'T-Bet: A Bridge between Innate and Adaptive Immunity', *Nat Rev Immunol*, 13 (2013) , 777-89.
- 79 K. Ley, C. Laudanna, M. I. Cybulsky, and S. Nourshargh, 'Getting to the Site of Inflammation: The Leukocyte Adhesion Cascade Updated', *Nat Rev Immunol*, 7 (2007) , 678-89.
- 80 M. O. Li, Y. Y. Wan, S. Sanjabi, A. K. Robertson, and R. A. Flavell, 'Transforming Growth Factor-Beta Regulation of Immune Responses', *Annu Rev Immunol*, 24 (2006) , 99-146.
- 81 K. J. Livak, and T. D. Schmittgen, 'Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative Pcr and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method', *Methods*, 25 (2001) , 402-8.
- 82 J. A. Lopez, C. Kearon, and A. Y. Lee, 'Deep Venous Thrombosis', *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* (2004) , 439-56.
- 83 R. Lüllmann-Rauch, *Histologie*. Vol. 4 (Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2003) , p. 694.
- 84 A. D. Luster, R. Alon, and U. H. von Andrian, 'Immune Cell Migration in Inflammation: Present and Future Therapeutic Targets', *Nat Immunol*, 6 (2005) , 1182-90.
- 85 I. G. Luzina, A. D. Keegan, N. M. Heller, G. A. Rook, T. Shea-Donohue, and S. P. Atamas, 'Regulation of Inflammation by Interleukin-4: A Review of "Alternatives"', *J Leukoc Biol*, 92 (2012) , 753-64.
- 86 F. Macian, S. H. Im, F. J. Garcia-Cozar, and A. Rao, 'T-Cell Anergy', *Curr Opin Immunol*, 16 (2004) , 209-16.
- 87 N. Mackman, 'Mouse Models, Risk Factors, and Treatments of Venous Thrombosis', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32 (2012) , 554-5.
- 88 D. H. Madsen, D. Leonard, A. Masedunskas, A. Moyer, H. J. Jurgensen, D. E. Peters, P. Amornphimoltham, A. Selvaraj, S. S. Yamada, D. A. Brenner, S. Burgdorf, L. H. Engelholm, N. Behrendt, K. Holmbeck, R. Weigert, and T. H. Bugge, 'M2-Like Macrophages Are Responsible for Collagen Degradation through a Mannose Receptor-Mediated Pathway', *J Cell Biol*, 202 (2013) , 951-66.
- 89 M. McCourt, J. H. Wang, S. Sookhai, and H. P. Redmond, 'Proinflammatory Mediators Stimulate Neutrophil-Directed Angiogenesis', *Arch Surg*, 134 (1999) , 1325-31; discussion 31-2.

- 90 M. D. McGavin, and J. F. Zachary, *Pathologie Der Haustiere*. Vol. 1 (Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH 2009) , p. 1340.
- 91 F. W. McNab, S. P. Berzins, D. G. Pellicci, K. Kyparissoudis, K. Field, M. J. Smyth, and D. I. Godfrey, 'The Influence of Cd1d in Postselection Nkt Cell Maturation and Homeostasis', *J Immunol*, 175 (2005) , 3762-8.
- 92 A. M. Miller, 'Role of Il-33 in Inflammation and Disease', *J Inflamm (Lond)* , 8 (2011) , 22.
- 93 A. M. Miller, D. Xu, D. L. Asquith, L. Denby, Y. Li, N. Sattar, A. H. Baker, I. B. McInnes, and F. Y. Liew, 'Il-33 Reduces the Development of Atherosclerosis', *J Exp Med*, 205 (2008) , 339-46.
- 94 C. D. Mills, 'M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease', *Crit Rev Immunol*, 32 (2012) , 463-88.
- 95 | | , 'Macrophage Arginine Metabolism to Ornithine/Urea or Nitric Oxide/Citrulline: A Life or Death Issue', *Crit Rev Immunol*, 21 (2001) , 399-425.
- 96 C. D. Mills, K. Kincaid, J. M. Alt, M. J. Heilman, and A. M. Hill, 'M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm', *J Immunol*, 164 (2000) , 6166-73.
- 97 A. S. Mirchandani, R. J. Salmond, and F. Y. Liew, 'Interleukin-33 and the Function of Innate Lymphoid Cells', *Trends Immunol*, 33 (2012) , 389-96.
- 98 B. Modarai, K. G. Burnand, J. Humphries, M. Waltham, and A. Smith, 'The Role of Neovascularisation in the Resolution of Venous Thrombus', *Thromb Haemost*, 93 (2005) , 801-9.
- 99 B. Modarai, K. G. Burnand, B. Sawyer, and A. Smith, 'Endothelial Progenitor Cells Are Recruited into Resolving Venous Thrombi', *Circulation*, 111 (2005) , 2645-53.
- 100 K. W. Moore, R. de Waal Malefyt, R. L. Coffman, and A. O'Garra, 'Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor', *Annu Rev Immunol*, 19 (2001) , 683-765.
- 101 O. Morel, F. Toti, L. Jesel, and J. M. Freyssinet, 'Mechanisms of Microparticle Generation: On the Trail of the Mitochondrion!', *Semin Thromb Hemost*, 36 (2010) , 833-44.
- 102 S. M. Morris, Jr., 'Arginine Metabolism: Boundaries of Our Knowledge', *J Nutr*, 137 (2007) , 1602S-09S.
- 103 K. A. Mosevoll, R. Lindas, T. H. Tvedt, O. Bruserud, and H. Reikvam, 'Altered Plasma Levels of Cytokines, Soluble Adhesion Molecules and Matrix Metalloproteases in Venous Thrombosis', *Thromb Res* (2015) .
- 104 D. M. Mosser, 'The Many Faces of Macrophage Activation', *J Leukoc Biol*, 73 (2003) , 209-12.
- 105 D. M. Mosser, and J. P. Edwards, 'Exploring the Full Spectrum of Macrophage Activation', *Nat Rev Immunol*, 8 (2008) , 958-69.

- 106 P. L. Mottram, L. J. Murray-Segal, W. Han, Y. Zhan, J. L. Brady, and A. M. Lew, 'Transgenic Anti-Cd4 Monoclonal Antibody Secretion by Mouse Segmental Pancreas Allografts Promotes Long Term Survival', *Transpl Immunol*, 8 (2000) , 203-9.
- 107 Consortium Mouse Genome Sequencing, R. H. Waterston, K. Lindblad-Toh, E. Birney, J. Rogers, J. F. Abril, P. Agarwal, R. Agarwala, R. Ainscough, M. Alexandersson, P. An, S. E. Antonarakis, J. Attwood, R. Baertsch, J. Bailey, K. Barlow, S. Beck, E. Berry, B. Birren, T. Bloom, P. Bork, M. Botcherby, N. Bray, M. R. Brent, D. G. Brown, S. D. Brown, C. Bult, J. Burton, J. Butler, R. D. Campbell, P. Carninci, S. Cawley, F. Chiaromonte, A. T. Chinwalla, D. M. Church, M. Clamp, C. Clee, F. S. Collins, L. L. Cook, R. R. Copley, A. Coulson, O. Couronne, J. Cuff, V. Curwen, T. Cutts, M. Daly, R. David, J. Davies, K. D. Delehaunty, J. Deri, E. T. Dermitzakis, C. Dewey, N. J. Dickens, M. Diekhans, S. Dodge, I. Dubchak, D. M. Dunn, S. R. Eddy, L. Elnitski, R. D. Emes, P. Eswara, E. Eyra, A. Felsenfeld, G. A. Fewell, P. Flicek, K. Foley, W. N. Frankel, L. A. Fulton, R. S. Fulton, T. S. Furey, D. Gage, R. A. Gibbs, G. Glusman, S. Gnerre, N. Goldman, L. Goodstadt, D. Grafham, T. A. Graves, E. D. Green, S. Gregory, R. Guigo, M. Guyer, R. C. Hardison, D. Haussler, Y. Hayashizaki, L. W. Hillier, A. Hinrichs, W. Hlavina, T. Holzer, F. Hsu, A. Hua, T. Hubbard, A. Hunt, I. Jackson, D. B. Jaffe, L. S. Johnson, M. Jones, T. A. Jones, A. Joy, M. Kamal, E. K. Karlsson, D. Karolchik, A. Kasprzyk, J. Kawai, E. Keibler, C. Kells, W. J. Kent, A. Kirby, D. L. Kolbe, I. Korf, R. S. Kucherlapati, E. J. Kulbokas, D. Kulp, T. Landers, J. P. Leger, S. Leonard, I. Letunic, R. Levine, J. Li, M. Li, C. Lloyd, S. Lucas, B. Ma, D. R. Maglott, E. R. Mardis, L. Matthews, E. Mauceli, J. H. Mayer, M. McCarthy, W. R. McCombie, S. McLaren, K. McLay, J. D. McPherson, J. Meldrim, B. Meredith, J. P. Mesirov, W. Miller, T. L. Miner, E. Mongin, K. T. Montgomery, M. Morgan, R. Mott, J. C. Mullikin, D. M. Muzny, W. E. Nash, J. O. Nelson, M. N. Nhan, R. Nicol, Z. Ning, C. Nusbaum, M. J. O'Connor, Y. Okazaki, K. Oliver, E. Overton-Larty, L. Pachter, G. Parra, K. H. Pepin, J. Peterson, P. Pevzner, R. Plumb, C. S. Pohl, A. Poliakov, T. C. Ponce, C. P. Ponting, S. Potter, M. Quail, A. Reymond, B. A. Roe, K. M. Roskin, E. M. Rubin, A. G. Rust, R. Santos, V. Sapojnikov, B. Schultz, J. Schultz, M. S. Schwartz, S. Schwartz, C. Scott, S. Seaman, S. Searle, T. Sharpe, A. Sheridan, R. Shownkeen, S. Sims, J. B. Singer, G. Slater, A. Smit, D. R. Smith, B. Spencer, A. Stabenau, N. Stange-Thomann, C. Sugnet, M. Suyama, G. Tesler, J. Thompson, D. Torrents, E. Trevaskis, J. Tromp, C. Ucla, A. Ureta-Vidal, J. P. Vinson, A. C. Von Niederhausern, C. M. Wade, M. Wall, R. J. Weber, R. B. Weiss, M. C. Wendl, A. P. West, K. Wetterstrand, R. Wheeler, S. Whelan, J. Wierzbowski, D. Willey, S. Williams, R. K. Wilson, E. Winter, K. C. Worley, D. Wyman, S. Yang, S. P. Yang, E. M. Zdobnov, M. C. Zody, and E. S. Lander, 'Initial

- Sequencing and Comparative Analysis of the Mouse Genome', *Nature*, 420 (2002) , 520-62.
- 108 D. D. Myers, A. E. Hawley, D. M. Farris, S. K. Wroblewski, P. Thanaporn, R. G. Schaub, D. D. Wagner, A. Kumar, and T. W. Wakefield, 'P-Selectin and Leukocyte Microparticles Are Associated with Venous Thrombogenesis', *J Vasc Surg*, 38 (2003) , 1075-89.
- 109 D. D. Myers, Jr., J. E. Rectenwald, P. W. Bedard, N. Kaila, G. D. Shaw, R. G. Schaub, D. M. Farris, A. E. Hawley, S. K. Wroblewski, P. K. Henke, and T. W. Wakefield, 'Decreased Venous Thrombosis with an Oral Inhibitor of P Selectin', *J Vasc Surg*, 42 (2005) , 329-36.
- 110 D. Myers, Jr., D. Farris, A. Hawley, S. Wroblewski, A. Chapman, L. Stoolman, R. Knibbs, R. Strieter, and T. Wakefield, 'Selectins Influence Thrombosis in a Mouse Model of Experimental Deep Venous Thrombosis', *J Surg Res*, 108 (2002) , 212-21.
- 111 M. Nahrendorf, M. J. Pittet, and F. K. Swirski, 'Monocytes: Protagonists of Infarct Inflammation and Repair after Myocardial Infarction', *Circulation*, 121 (2010) , 2437-45.
- 112 T. Nolan, R. E. Hands, and S. A. Bustin, 'Quantification of Mrna Using Real-Time Rt-Pcr', *Nat Protoc*, 1 (2006) , 1559-82.
- 113 M. Nosaka, Y. Ishida, A. Kimura, and T. Kondo, 'Time-Dependent Appearance of Intrathrombus Neutrophils and Macrophages in a Stasis-Induced Deep Vein Thrombosis Model and Its Application to Thrombus Age Determination', *Int J Legal Med*, 123 (2009) , 235-40.
- 114 | | , 'Time-Dependent Organic Changes of Intravenous Thrombi in Stasis-Induced Deep Vein Thrombosis Model and Its Application to Thrombus Age Determination', *Forensic Sci Int*, 195 (2010) , 143-7.
- 115 M. Nosaka, Y. Ishida, A. Kimura, Y. Kuninaka, M. Inui, N. Mukaida, and T. Kondo, 'Absence of Ifn-Gamma Accelerates Thrombus Resolution through Enhanced Mmp-9 and Vegf Expression in Mice', *J Clin Invest*, 121 (2011) , 2911-20.
- 116 A. T. Obi, J. A. Diaz, N. L. Ballard-Lipka, K. J. Roelofs, D. M. Farris, D. A. Lawrence, T. W. Wakefield, and P. K. Henke, 'Plasminogen Activator-1 Overexpression Decreases Experimental Postthrombotic Vein Wall Fibrosis by a Non-Vitronectin-Dependent Mechanism', *J Thromb Haemost*, 12 (2014) , 1353-63.
- 117 A. P. Owens, 3rd, and N. Mackman, 'Microparticles in Hemostasis and Thrombosis', *Circ Res*, 108 (2011) , 1284-97.
- 118 S. L. Peng, 'The T-Box Transcription Factor T-Bet in Immunity and Autoimmunity', *Cell Mol Immunol*, 3 (2006) , 87-95.

- 119 M. W. Pfaffel, 'Real-Time Rt-Pcr: Neue Ansätze Zur Exakten Mrna Quantifizierung', *BIOspektrum*, 1 (2004) , 92-95.
- 120 A. Piccin, W. G. Murphy, and O. P. Smith, 'Circulating Microparticles: Pathophysiology and Clinical Implications', *Blood Rev*, 21 (2007) , 157-71.
- 121 S. S. Pierangeli, and E. N. Harris, 'Antiphospholipid Antibodies in an in Vivo Thrombosis Model in Mice', *Lupus*, 3 (1994) , 247-51.
- 122 C. Punzo, and C. L. Cepko, 'Ultrasound-Guided in Utero Injections Allow Studies of the Development and Function of the Eye', *Dev Dyn*, 237 (2008) , 1034-42.
- 123 R. Ram, D. M. Mickelsen, C. Theodoropoulos, and B. C. Blaxall, 'New Approaches in Small Animal Echocardiography: Imaging the Sounds of Silence', *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 301 (2011) , H1765-80.
- 124 L. V. Reddy, C. Ring, A. Kumar, and V. P. Kurup, 'Depletion of Cd4 Cells in Mice with Intraperitoneal Injection of Alginate-Encapsulated Gk 1.5 Hybridoma Cells: A Potential Use in Development of Animal Models for Infectious Diseases', *J Infect Dis*, 168 (1993) , 1082-3.
- 125 K. L. Rock, and H. Kono, 'The Inflammatory Response to Cell Death', *Annu Rev Pathol*, 3 (2008) , 99-126.
- 126 P. Saha, J. Humphries, B. Modarai, K. Mattock, M. Waltham, C. E. Evans, A. Ahmad, A. S. Patel, S. Premaratne, O. T. Lyons, and A. Smith, 'Leukocytes and the Natural History of Deep Vein Thrombosis: Current Concepts and Future Directions', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31 (2011) , 506-12.
- 127 M. W. Saif, R. Bona, and B. Greenberg, 'Aids and Thrombosis: Retrospective Study of 131 Hiv-Infected Patients', *AIDS Patient Care STDS*, 15 (2001) , 311-20.
- 128 G. Salzmann, 'Leitlinie Zur Diagnostik Und Therapie Des Postthrombotisches Syndroms', *DGG* (2008) , 10.
- 129 S. Sanada, D. Hakuno, L. J. Higgins, E. R. Schreiter, A. N. McKenzie, and R. T. Lee, 'Ii-33 and St2 Comprise a Critical Biomechanically Induced and Cardioprotective Signaling System', *J Clin Invest*, 117 (2007) , 1538-49.
- 130 A. Schellhaass, A. Walther, S. Konstantinides, and B. W. Bottiger, 'The Diagnosis and Treatment of Acute Pulmonary Embolism', *Dtsch Arztebl Int*, 107 (2010) , 589-95.
- 131 T. Schönfelder, 'Mausmodelle Der Tiefen Venenthrombose', *Gefäßschirurgie*, 19 (2014) , 257-62.

-
- 132 K. Schroder, P. J. Hertzog, T. Ravasi, and D. A. Hume, 'Interferon-Gamma: An Overview of Signals, Mechanisms and Functions', *J Leukoc Biol*, 75 (2004) , 163-89.
- 133 C. Schulz, B. Engelmann, and S. Massberg, 'Crossroads of Coagulation and Innate Immunity: The Case of Deep Vein Thrombosis', *J Thromb Haemost*, 11 Suppl 1 (2013) , 233-41.
- 134 D. L. Schwartz, J. Bankson, L. Bidaut, Y. He, R. Williams, R. Lemos, A. K. Thitai, J. Oh, A. Volgin, S. Soghomonyan, H. H. Yeh, R. Nishii, U. Mukhopadhyay, M. Alauddin, I. Mushkudiani, N. Kuno, S. Krishnan, W. Bornman, S. Y. Lai, G. Powis, J. Hazle, and J. Gelovani, 'Hif-1-Dependent Stromal Adaptation to Ischemia Mediates in Vivo Tumor Radiation Resistance', *Mol Cancer Res*, 9 (2011) , 259-70.
- 135 J. H. Scurr, S. J. Machin, S. Bailey-King, I. J. Mackie, S. McDonald, and P. D. Smith, 'Frequency and Prevention of Symptomless Deep-Vein Thrombosis in Long-Haul Flights: A Randomised Trial', *Lancet*, 357 (2001) , 1485-9.
- 136 N. V. Serbina, and E. G. Pamer, 'Monocyte Emigration from Bone Marrow During Bacterial Infection Requires Signals Mediated by Chemokine Receptor Ccr2', *Nat Immunol*, 7 (2006) , 311-7.
- 137 E. Shantsila, and G. Y. Lip, 'The Role of Monocytes in Thrombotic Disorders. Insights from Tissue Factor, Monocyte-Platelet Aggregates and Novel Mechanisms', *Thromb Haemost*, 102 (2009) , 916-24.
- 138 R. J. Shebuski, and K. S. Kilgore, 'Role of Inflammatory Mediators in Thrombogenesis', *J Pharmacol Exp Ther*, 300 (2002) , 729-35.
- 139 C. Shi, and E. G. Pamer, 'Monocyte Recruitment During Infection and Inflammation', *Nat Rev Immunol*, 11 (2011) , 762-74.
- 140 D. Shweiki, A. Itin, D. Soffer, and E. Keshet, 'Vascular Endothelial Growth Factor Induced by Hypoxia May Mediate Hypoxia-Initiated Angiogenesis', *Nature*, 359 (1992) , 843-5.
- 141 I. Singh, K. G. Burnand, M. Collins, A. Luttun, D. Collen, B. Boelhouwer, and A. Smith, 'Failure of Thrombus to Resolve in Urokinase-Type Plasminogen Activator Gene-Knockout Mice: Rescue by Normal Bone Marrow-Derived Cells', *Circulation*, 107 (2003) , 869-75.
- 142 I. Singh, A. Smith, B. Vanzielegheem, D. Collen, K. Burnand, J. M. Saint-Remy, and M. Jacquemin, 'Antithrombotic Effects of Controlled Inhibition of Factor VIII with a Partially Inhibitory Human Monoclonal Antibody in a Murine Vena Cava Thrombosis Model', *Blood*, 99 (2002) , 3235-40.
- 143 F. K. Swirski, M. Nahrendorf, M. Etzrodt, M. Wildgruber, V. Cortez-Retamozo, P. Panizzi, J. L. Figueiredo, R. H. Kohler, A. Chudnovskiy, P. Waterman, E. Aikawa, T.

- R. Mempel, P. Libby, R. Weissleder, and M. J. Pittet, 'Identification of Splenic Reservoir Monocytes and Their Deployment to Inflammatory Sites', *Science*, 325 (2009) , 612-6.
- 144 S. J. Szabo, S. T. Kim, G. L. Costa, X. Zhang, C. G. Fathman, and L. H. Glimcher, 'A Novel Transcription Factor, T-Bet, Directs Th1 Lineage Commitment', *Cell*, 100 (2000) , 655-69.
- 145 S. J. Szabo, B. M. Sullivan, C. Stemmann, A. R. Satoskar, B. P. Sleckman, and L. H. Glimcher, 'Distinct Effects of T-Bet in Th1 Lineage Commitment and Ifn-Gamma Production in Cd4 and Cd8 T Cells', *Science*, 295 (2002) , 338-42.
- 146 F. Takizawa, S. Magadan, D. Parra, Z. Xu, T. Korytar, P. Boudinot, and J. O. Sunyer, 'Novel Teleost Cd4-Bearing Cell Populations Provide Insights into the Evolutionary Origins and Primordial Roles of Cd4+ Lymphocytes and Cd4+ Macrophages', *J Immunol*, 196 (2016) , 4522-35.
- 147 V. F. Tapson, 'Acute Pulmonary Embolism', *Cardiol Clin*, 22 (2004) , 353-65, v.
- 148 A. Torbicki, A. Perrier, S. Konstantinides, G. Agnelli, N. Galie, P. Pruszczyk, F. Bengel, A. J. Brady, D. Ferreira, U. Janssens, W. Klepetko, E. Mayer, M. Remy-Jardin, J. P. Bassand, and E. S. C. Committee for Practice Guidelines, 'Guidelines on the Diagnosis and Management of Acute Pulmonary Embolism: The Task Force for the Diagnosis and Management of Acute Pulmonary Embolism of the European Society of Cardiology (Esc) ', *Eur Heart J*, 29 (2008) , 2276-315.
- 149 L. van Rijt, H. von Richthofen, and R. van Ree, 'Type 2 Innate Lymphoid Cells: At the Cross-Roads in Allergic Asthma', *Semin Immunopathol* (2016) .
- 150 M. R. Varma, D. M. Moaveni, N. A. Dewyer, A. J. Varga, K. B. Deatrick, S. L. Kunkel, G. R. Upchurch, Jr., T. W. Wakefield, and P. K. Henke, 'Deep Vein Thrombosis Resolution Is Not Accelerated with Increased Neovascularization', *J Vasc Surg*, 40 (2004) , 536-42.
- 151 M. R. Varma, A. J. Varga, B. S. Knipp, P. Sukheepod, G. R. Upchurch, S. L. Kunkel, T. W. Wakefield, and P. K. Henke, 'Neutropenia Impairs Venous Thrombosis Resolution in the Rat', *J Vasc Surg*, 38 (2003) , 1090-8.
- 152 L. M. Vieira, L. M. Dusse, A. P. Fernandes, O. A. Martins-Filho, M. de Bastos, M. F. Ferreira, A. J. Cooper, B. A. Lwaleed, and M. G. Carvalho, 'Monocytes and Plasma Tissue Factor Levels in Normal Individuals and Patients with Deep Venous Thrombosis of the Lower Limbs: Potential Diagnostic Tools?', *Thromb Res*, 119 (2007) , 157-65.
- 153 E. Vivier, E. Tomasello, M. Baratin, T. Walzer, and S. Ugolini, 'Functions of Natural Killer Cells', *Nat Immunol*, 9 (2008) , 503-10.

- 154 Y. Vodovotz, C. Bogdan, J. Paik, Q. W. Xie, and C. Nathan, 'Mechanisms of Suppression of Macrophage Nitric Oxide Release by Transforming Growth Factor Beta', *J Exp Med*, 178 (1993) , 605-13.
- 155 M. L. von Bruhl, K. Stark, A. Steinhart, S. Chandraratne, I. Konrad, M. Lorenz, A. Khandoga, A. Tirniceru, R. Coletti, M. Kollnberger, R. A. Byrne, I. Laitinen, A. Walch, A. Brill, S. Pfeiler, D. Manukyan, S. Braun, P. Lange, J. Riegger, J. Ware, A. Eckart, S. Haidari, M. Rudelius, C. Schulz, K. Ehtler, V. Brinkmann, M. Schwaiger, K. T. Preissner, D. D. Wagner, N. Mackman, B. Engelmann, and S. Massberg, 'Monocytes, Neutrophils, and Platelets Cooperate to Initiate and Propagate Venous Thrombosis in Mice in Vivo', *J Exp Med*, 209 (2012) , 819-35.
- 156 T. W. Wakefield, D. D. Myers, and P. K. Henke, 'Mechanisms of Venous Thrombosis and Resolution', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28 (2008) , 387-91.
- 157 M. Waltham, K. G. Burnand, M. Collins, and A. Smith, 'Vascular Endothelial Growth Factor and Basic Fibroblast Growth Factor Are Found in Resolving Venous Thrombi', *J Vasc Surg*, 32 (2000) , 988-96.
- 158 W. T. Watford, B. D. Hissong, J. H. Bream, Y. Kanno, L. Muul, and J. J. O'Shea, 'Signaling by Il-12 and Il-23 and the Immunoregulatory Roles of Stat4', *Immunol Rev*, 202 (2004) , 139-56.
- 159 P. Wenzel, M. Knorr, S. Kossmann, J. Stratmann, M. Hausding, S. Schuhmacher, S. H. Karbach, M. Schwenk, N. Yorgev, E. Schulz, M. Oelze, S. Grabbe, H. Jonuleit, C. Becker, A. Daiber, A. Waisman, and T. Munzel, 'Lysozyme M-Positive Monocytes Mediate Angiotensin Ii-Induced Arterial Hypertension and Vascular Dysfunction', *Circulation*, 124 (2011) , 1370-81.
- 160 S. Willenborg, T. Lucas, G. van Loo, J. A. Knipper, T. Krieg, I. Haase, B. Brachvogel, M. Hammerschmidt, A. Nagy, N. Ferrara, M. Pasparakis, and S. A. Eming, 'Ccr2 Recruits an Inflammatory Macrophage Subpopulation Critical for Angiogenesis in Tissue Repair', *Blood*, 120 (2012) , 613-25.
- 161 B. M. Wojcik, S. K. Wroblewski, A. E. Hawley, T. W. Wakefield, D. D. Myers, Jr., and J. A. Diaz, 'Interleukin-6: A Potential Target for Post-Thrombotic Syndrome', *Ann Vasc Surg*, 25 (2011) , 229-39.
- 162 K.T. Wolf, 'Postthrombotisches Syndrom', *ARS MEDICI*, 12 (2013) , 661-64.
- 163 S. K. Wroblewski, D. M. Farris, J. A. Diaz, D. D. Myers, Jr., and T. W. Wakefield, 'Mouse Complete Stasis Model of Inferior Vena Cava Thrombosis', *J Vis Exp* (2011) .
- 164 G. Wu, and S. M. Morris, Jr., 'Arginine Metabolism: Nitric Oxide and Beyond', *Biochem J*, 336 (Pt 1) (1998) , 1-17.

-
- 165 T. A. Wynn, and L. Barron, 'Macrophages: Master Regulators of Inflammation and Fibrosis', *Semin Liver Dis*, 30 (2010) , 245-57.
- 166 T. Yoshimoto, and W. E. Paul, 'Cd4pos, Nk1.1pos T Cells Promptly Produce Interleukin 4 in Response to in Vivo Challenge with Anti-Cd3', *J Exp Med*, 179 (1994) , 1285-95.
- 167 X. Zhou, A. Nicoletti, R. Elhage, and G. K. Hansson, 'Transfer of Cd4(+) T Cells Aggravates Atherosclerosis in Immunodeficient Apolipoprotein E Knockout Mice', *Circulation*, 102 (2000) , 2919-22.
- 168 X. Zhou, A. K. Robertson, M. Rudling, P. Parini, and G. K. Hansson, 'Lesion Development and Response to Immunization Reveal a Complex Role for Cd4 in Atherosclerosis', *Circ Res*, 96 (2005) , 427-34.
- 169 J. Zhu, and W. E. Paul, 'Cd4 T Cells: Fates, Functions, and Faults', *Blood*, 112 (2008) , 1557-69.

X. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Vergleichende Darstellung des differentiellen Blutbildes von Mensch und Maus (Modifiziert nach ³⁰).....	18
Tabelle 2:	Verwendete Laborgeräte und technisches Zubehör.....	30
Tabelle 3:	Utensilien Ultraschallkopf.....	31
Tabelle 4:	Verwendete chirurgische Instrumente.....	31
Tabelle 5:	Verwendetes Verbrauchsmaterial.....	31
Tabelle 6:	Verwendete Lösungen.....	33
Tabelle 7:	RNA-Analyse Kit.....	35
Tabelle 8:	Verwendete FACS-Antikörper und Fluorochrome.....	35
Tabelle 9:	Verwendete Primer.....	36
Tabelle 10:	Verwendete Puffer.....	36
Tabelle 11:	Verwendete Software.....	37
Tabelle 12:	Dosierung der Anästhetika und der dazu benötigten Antagonisten....	46

XI. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aufbaues der Venenwand.(Modifiziert nach ⁶⁶).....	8
Abbildung 2: Virchow-Trias der Thrombosebildung.....	10
Abbildung 3: Anatomische Darstellung der abdominalen venösen Gefäße der 17	
Abbildung 4: Differenzierungsmöglichkeiten von naiven CD4-Zellen.	23
Abbildung 5: Schematische Darstellung des iDTR Systems in der Maus (modifiziert nach ¹³).....	41
Abbildung 6: Depletion von myelomonozytären Zellen im Verlauf der Behandlung mit DTX.	42
Abbildung 7: Schematische Übersicht der Versuchsabläufe im Modell der LysMCre-iDTR Maus.	43
Abbildung 8: Vevo 770 Imaging System und verwendeter Schallkopf.	49
Abbildung 9: Bildgebende Station/ Anästhesieeinheit	50
Abbildung 10: Prinzip der B-Mode Darstellung.....	51
Abbildung 11: Prinzip der Dopplerfunktion.	52
Abbildung 12: Farbkodierte Doppler-Sonographie der <i>Vena cava caudalis</i> mit gebildetem Thrombus.....	53
Abbildung 13: Streulich Dot-Plot, Durchflusszytometrie, Blutzellen im SSC/ FSC. 57	
Abbildung 14: Schematische Darstellung der Aufarbeitung von Vollblut mit Histopaque 1119/1077.	61
Abbildung 15: Funktion einer TaqMan Sonde.	63
Abbildung 16: Duplex-sonographische Darstellung der Flussgeschwindigkeit in der <i>Vena cava caudalis</i> der Maus.	67
Abbildung 17: Duplex-sonographische Darstellung der Flussgeschwindigkeit in der <i>Vena cava caudalis</i> der Maus nach Induktion einer <i>Vena cava</i> Ligatur.	68
Abbildung 18: Reduktion der Flussgeschwindigkeit nach Stenosierung der <i>Vena cava caudalis</i>	68
Abbildung 19: B-Mode Darstellung eines Thrombus der <i>Vena cava caudalis</i> in der Längsachse und Thrombus nach anschließender Isolation.	69
Abbildung 20: Korrelation der Thrombenlänge (Ultraschallmessung vs. isoliert).	70

Abbildung 21: <i>Vena cava caudalis</i> in situ mit zwei lateral abgehenden Seitenästen.	71
Abbildung 22: Korrelation von Thrombengewicht zum Abstand des Seitenastes/ Korrelation Thrombenlänge zum Abstand des Seitenastes.	72
Abbildung 23: Korrelation von Thrombengewicht bzw. Thrombenlänge zur Fluss- geschwindigkeit des Blutes.	73
Abbildung 24: Einfluss des Abstandes vom Seitenast zur Ligaturstelle.	74
Abbildung 25: Die Ligation venöser Seitenäste beeinflusst weder das Auftreten noch das Gewicht venöser Thromben.	75
Abbildung 26: Durchflusszytometrische Analyse der Anzahl CD45 positiver, lebender Zellen im Thrombengewebe.	77
Abbildung 27: Durchflusszytometrisch bestimmter prozentualer Anteil an neutrophilen Granulozyten in der <i>Vena cava caudalis</i> und im Thrombengewebe.	79
Abbildung 28: Durchflusszytometrisch bestimmter prozentualer Anteil an Monozyten in der <i>Vena cava caudalis</i> und im Thrombengewebe.	81
Abbildung 29: Durchflusszytometrisch bestimmter prozentualer Anteil an T-Zellen in der <i>Vena cava caudalis</i> und im Thrombengewebe.	82
Abbildung 30: Durchflusszytometrisch bestimmter prozentualer Anteil an CD4 posi- tiven Zellen in der <i>Vena cava caudalis</i> und im Thrombengewebe.	84
Abbildung 31: Durchflusszytometrisch bestimmter prozentualer Anteil an NK1.1/TCR beta positiven NKT-Zellen in der <i>Vena cava caudalis</i> und im Thrombengewebe.	85
Abbildung 32: Durchflusszytometrisch bestimmter prozentualer Anteil an NK-Zellen in der <i>Vena cava caudalis</i> und im Thrombengewebe.	87
Abbildung 33: Durchflusszytometrie immunologisch markierter Monozyten/neutro- philer Granulozyten in Blutproben entnommen für das Regime der Thrombusentstehung gemäß Abb. 7_A im Modell der LysMCre-iDTR Maus.	90
Abbildung 34: Durchflusszytometrisch bestimmte zelluläre Infiltration des Venensegmentes für das Regime der Thrombusentstehung gemäß Abb. 7_A im Modell der LysMCre-iDTR Maus.	91
Abbildung 35: Durchflusszytometrisch bestimmte zelluläre Infiltration des Thrombengewebes für das Regime der Thrombusentstehung gemäß Abb. 7_A im Modell der LysMCre-iDTR Maus.	92

Abbildung 36: Thrombengewicht und Thrombenlänge für das Regime der Thrombusentstehung gemäß Abb. 7_A im Modell der LysMCre-iDTR Maus.	93
Abbildung 37: Thrombengewicht und Thrombenlänge für das Regime der Thrombenauflösung gemäß Abb. 7_B1 im Modell der LysMCre-iDTR Maus. ...	95
Abbildung 38: Repräsentative B-Mode Darstellung der zeitabhängigen Auflösung eines Thrombus in der <i>Vena cava caudalis</i> für das Regime der Thrombusauflösung gemäß Abb. 7_B2 im Modell der LysMCre-iDTR Maus.	96
Abbildung 39: Auf Ultraschalluntersuchungen (B-Mode) basierende quantitative Analyse der Auflösung eines Thrombus in der <i>Vena cava caudalis</i> gemäß Regime Abb. 7_B2 im Modell der LysMCre-iDTR Maus.	98
Abbildung 40: Durchflusszytometrie immunologisch markierter Monozyten/neutrophiler Granulozyten in Blutproben entnommen für das Regime der Thrombusentstehung gemäß Abb. 7_B1 im Modell der LysMCre-iDTR Maus.	99
Abbildung 41: Durchflusszytometrisch bestimmte zelluläre Zusammensetzung des Venengewebes aus behandelten LysMCre-iDTR und LysMCre Mäusen innerhalb der Auflösungsstudie 48 Stunden nach Liagtur der <i>Vena cava caudalis</i> gemäß Abb. 7_B1 im Modell der LysMCre-iDTR Maus.	101
Abbildung 42: Durchflusszytometrisch bestimmte zelluläre Zusammensetzung des Thrombengewebes aus behandelten LysMCre-iDTR und LysMCre Mäusen innerhalb der Auflösungsstudie 48 Stunden nach Liagtur der <i>Vena cava caudalis</i> gemäß Abb. 7_B1 im Modell der LysMCre-iDTR Maus.	102
Abbildung 43: RT-PCR Analyse zur mRNA Expression von CCL 2, TF und IL4 im Thrombengewebe der behandelten LysMCre-iDTR und LysMCre Mäuse im Rahmen der Auflösungsstudie 48 Stunden nach Liagtur der <i>Vena cava caudalis</i> gemäß Abb. 7_B1 im Modell der LysMCre-iDTR Maus.	103
Abbildung 44: Durchflusszytometrie fluoreszenzmarkierter AnnexinV positiver/7-AAD negativer apoptotischer Zellen in Blutproben von LysMCre und LysMCre-iDTR Mäusen nach einer dreitägigen Behandlung mit DTX gemäß Abb. 7_B1.	104

Abbildung 45: RT-PCR Analyse zur mRNA Expression von TF, VCAM und CCL2 im Venengewebe der LysMCre und LysMCre-iDTR Mäuse nach dreitätiger Diphtherietoxin Gabe gemäß Abb. 7_B1.....	105
Abbildung 46: Thrombengewicht und Thrombenlänge nach Ligatur der <i>Vena cava caudalis</i> : Kontrollmaus (B6) versus Tbx 21 ko Maus.....	108
Abbildung 47: Repräsentative B-Mode Darstellung der zeitabhängigen Auflösung eines Thrombus im Vergleich zwischen Kontrolle versus Tbx 21 ko Maus.	109
Abbildung 48: Ultraschallbasierende B-Mode Auswertung der Auflösungsstudie Wildtyp gegen Tbx 21 ko.	111
Abbildung 49: Durchflusszytometrie immunologisch markierter neutrophiler Granulozyten, infl. Monozyten, Makrophagen, T-Zellen sowie CD 4 positiver Zellen im Thrombengewebe im Modell der Tbx 21 ko Maus	113
Abbildung 50: mRNA Zytokinmuster in der <i>Vena cava caudalis</i> im Modell der Tbx 21 ko Maus zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion einer venösen Thrombose.	115
Abbildung 51: mRNA Zytokinmuster in der <i>Vena cava caudalis</i> im Modell der Tbx 21 ko Maus zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion einer venösen Thrombose.	116
Abbildung 52: mRNA Zytokinmuster desThrombengewebes im Modell der Tbx 21 ko Maus zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion einer venösen Thrombose.	117
Abbildung 53: mRNA Zytokinmuster desThrombengewebes im Modell der Tbx 21 ko Maus zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion einer venösen Thrombose.	118
Abbildung 54: FACS-Daten der Analyse CD4 positiver T-Zellen im Thrombengewebe der C57BL/6 Maus nach <i>Vena cava caudalis</i> Ligatur.....	119
Abbildung 55: Vergleichende Darstellung von Thrombengewicht und -länge zwischen CD4 depletierter und Kontrollmaus (C57BL/6).	121
Abbildung 56: Durchflusszytometrisch bestimmte zelluläre Zusammensetzung des Venengewebes aus Kontroll- und CD4 depletierten Mäusen mit Ligatur der <i>Vena cava caudalis</i>	122

-
- Abbildung 57: Durchflusszytometrisch bestimmte zelluläre Zusammensetzung des Thrombengewebes aus Kontroll- und CD4 depletierten Mäusen mit Ligatur der *Vena cava caudalis*. 123
- Abbildung 58: Von Immunzellen produzierte Zytokine führen zur Stimulation verschiedener Makrophagenpopulationen (modifiziert nach ¹⁰⁵) 137

XII. Abkürzungsverzeichnis

B-Mode	engl. brightness modulation
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	engl. Cluster of differentiation
CCL	Chemokinligand
CCR	Chemokinrezeptor
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (engl. complementary DNA)
DEPC	Diethyldicarbonat
DTR	Diphtherietoxin-Rezeptor
DTX	Diphtherietoxin
EPC	endotheliale Vorläuferzelle
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FAM	6-Carboxy-Fluorescein
FCS	fötales Kälberserum
GIT	Guanidiniumisothiocyanat
ICAM	interzelluläres Adhäsionsmolekül
IFN	Interferon
IL	Interleukin
iDTR	induzierbarer Diphtherietoxinrezeptor
IVC	Inferior Vena cava
KH	Krebs Henseleit
LysM	Lysozym M
MCP-1	Monozytne chemotaktisches Protein 1
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl. messenger RNA)
NET`s	engl. neutrophil extracellular traps
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	Stickoxid
PAI-1	Plasminogenaktivator Inhibitor

PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PS	Phosphatidylserin
PW-Doppler	Pulsed wave Doppler
qRT	quantitative PCR mit vorangegangener reversen Transkription
RNA	Ribonukleinsäure
Tbet	engl. T-box transcription factor
TBP	engl. TATA-box binding protein
TCR	T-Zellrezeptor
TF	Thromboplastin (engl. tissue factor)
TFPI	Thromboplastininhibitor
T _H	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
tPA	Plasminogenaktivator vom Gewebetyp
TGF β	transformierender Wachstumsfaktor beta
uPA	Urokinase-Plasminogenaktivator
VCAM	vaskuläres Zelladhäsionsprotein
VEGF	Endothelwachstumsfaktor
Vol	Volumen
vWF	von-Willebrand-Faktor

XIII. Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger bedanke ich mich für die Übernahme der Arbeit, deren Durchsicht und Einreichung an der Tierärztlichen Fakultät der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Bei Herrn PD Dr. med. Philip Wenzel bedanke ich mich besonders für die interessante Themenstellung und die kompetente wissenschaftliche Projektbetreuung, sowie für seine Hilfestellungen, Anregungen und Diskussionsbereitschaft bei allen auftretenden Fragen.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meiner Arbeitsgruppe, Dr. Sabine Kossmann, Dr. Melanie Schwenk, Dr. Christian Becker, Stefanie Finger und Katharina Perius für die liebevolle, herzliche Arbeitsatmosphäre, die hervorragende Betreuung, sowie für die kompetente Hilfestellung, einmalige Unterstützung und Motivation.

Mein größter Dank gilt meinem Mann, der mich während meines Studiums unterstützt und mir während meiner Doktorarbeit immer helfend zur Seite gestanden hat.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6549-2



9 783835 196549 2